

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПОЧЕТНОГО АКАДЕМИКА Н.Ф. ГАМАЛЕИ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Деркаев Артем Алексеевич

**ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА СПЕЦИФИЧНЫЕ К ТОКСИНУ
S.VOTULINIM И ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ
ТЕРАПИИ БОТУЛИЗМА**

3.2.7. – Иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,

Есмагамбетов И.Б.

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Ботулизм.....	15
1.1.1 Этиология.....	15
1.1.2 Эпидемиология.....	16
1.1.3 Патофизиология	18
1.1.4 Токсикокинетика.....	21
1.1.5 Симптоматика	22
1.1.6 Терапия и профилактика	23
1.2 Моноклональные антитела.....	26
1.2.1 Получение моноклональных антител	31
1.2.2 Фармакокинетика моноклональных антител	37
1.2.3 Однодоменные антитела	41
1.3 Моноклональные антитела для терапии ботулизма.....	45
1.3.1 Механизм нейтрализации токсинов моноклональными антителами и роль Fc-фрагмента в эффективной нейтрализации	48
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	52
2.1 Материалы	52
2.1.1 Лабораторные животные.....	52
2.1.2 Клеточные линии и бактериальные штаммы	53
2.1.3 Плазмидные векторы	53
2.1.4 Антитела и рекомбинантные белки	54
2.1.5 Реактивы для культуры эукариотических клеток.....	54
2.1.6 Микробиологические реактивы	54
2.1.7 Реактивы для молекулярной биологии	55
2.1.8 Материалы для очистки и фильтрации.....	55
2.1.9 Материалы для анализа	55
2.1.10 Другие реагенты.....	56
2.2 Оборудование	57
2.3 Расходные материалы	59
2.4 Методы	59

2.4.1 Основные использованные методы	59
2.4.2 Получение VoNT/A	65
2.4.3 Получение эукариотического клона-продуцента, стабильно продуцирующего VHH-Fc.....	65
2.4.4 Оптимизация процесса культивирования	69
2.4.5 Продукция VHH-Fc стабильным клоном-продуцентом в лабораторном масштабе	70
2.4.6 Хроматографическая очистка VHH-Fc.....	71
2.4.7 Противовирусная фильтрация и формулирование препарата.....	72
2.4.8 Определение чистоты антитела методом гель-фильтрации.....	72
2.4.9 Определение чистоты антитела методом измерения размера наночастиц в растворе.....	73
2.4.10 Изучение наличия остаточной ДНК штамма-продуцента.....	73
2.4.11 Изучение наличия остаточных белков штамма-продуцента и белка А .	74
2.4.12 Исследование пирогенности препарата антител B11-Fc	74
2.4.13 Определение гликанового профиля антитела методом гель-фильтрации.....	74
2.4.14 Измерение аффинности взаимодействия Fc-фрагмента VHH-Fc с разными классами Fc рецепторов	75
2.4.15 Изучение возможности Fc-зависимой активации комплемента антителом VHH-Fc.....	75
2.4.16 Оценка токсичности VoNT/A на острой внутрибрюшинной и внутрижелудочной моделях интоксикаций	76
2.4.17 Подбор протективной дозы VHH-Fc против 10 LD ₅₀ VoNT/A	76
2.4.18 Оценка защитного потенциала протективной дозы VHH-Fc против высоких доз VoNT/A.....	76
2.4.19 Фармакокинетика и изучение защиты от внутрибрюшинной интоксикации VoNT/A в различных режимах применения VHH-Fc <i>in vivo</i>	77
2.4.20 Изучение возможности терапии VHH-Fc при внутрижелудочной интоксикации мышей VoNT/A <i>in vivo</i>	78
2.4.21 Доклиническое изучение фармакокинетики VHH-Fc.....	78
2.4.22 Доклиническое исследование острой токсичности и местного раздражающего действия препарата VHH-Fc.....	80
2.4.23 Доклиническое исследование токсичности и местной токсичности при многократном введении препарата VHH-Fc крысам	81

2.4.24 Доклиническое исследование токсичности и местной токсичности при многократном введении препарата VHH-Fc кроликам.....	87
2.4.25 Доклиническое исследование иммунотоксических свойств препарата VHH-Fc.....	88
2.4.26 Доклиническое исследование аллергизирующих свойств препарата VHH-Fc.....	91
2.4.27 Клинические исследования безопасности препарата	95
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	99
3.1 Создание кандидатного препарата на основе модифицированного однодоменного антитела и разработка технологии его получения	99
3.1.1 Получение и характеристика препарата ботулинического токсина типа А	99
3.1.2 Получение панели однодоменных антител и отбор нейтрализующих клонов.....	101
3.1.3 Получение модифицированных однодоменных антител B11-Fc и G3-Fc, и изучение их нейтрализующей активности в отношении ботулотоксина типа А	101
3.1.4 Дизайн генетической конструкции, кодирующей антитело B11, слитое с Fc-фрагментом человеческого IgG1.....	102
3.1.5 Получение клона-продуцента, стабильно продуцирующего антитело B11-Fc.....	105
3.1.6 Исследование генетической стабильности клона-продуцента антитела B11-Fc. Создание системы банков	109
3.1.7 Оптимизация процесса культивирования для продукции антитела B11-Fc.....	110
3.1.8 Разработка технологии очистки модифицированного однодоменного антитела B11-Fc.....	112
3.2 Изучение физико-химических и иммунологических характеристик кандидатного препарата	117
3.2.1 Исследование чистоты препарата B11-Fc и определение гликанового профиля	117
3.2.2 Измерение аффинности взаимодействия Fc-фрагмента антитела B11-Fc с разными классами Fc рецепторов	119
3.2.3 Изучение Fc-зависимой активации комплемента антителом B11-Fc.....	120

3.3 Доклинические исследования эффективности кандидатного препарата на основе модифицированного однодоменного антитела B11-Fc	121
3.3.1 Острая внутрибрюшинная модель интоксикации мышей VoNT/A.....	121
3.3.2 Внутрижелудочная модель интоксикации мышей VoNT/A.....	122
3.3.3 Подбор протективной дозы антитела B11-Fc на острой модели интоксикации 10 LD ₅₀ VoNT/A.....	124
3.3.4 Оценка защитного потенциала протективной дозы антитела B11-Fc на острой модели интоксикации VoNT/A	125
3.3.5 Изучение фармакокинетики B11-Fc и защиты от внутрибрюшинной интоксикации VoNT/A в различных режимах применения антитела <i>in vivo</i> .	125
3.3.6 Изучение возможности терапии антителом B11-Fc при внутрижелудочной интоксикации мышей VoNT/A <i>in vivo</i>	128
3.4 Доклинические исследования безопасности кандидатного препарата на основе модифицированного однодоменного антитела B11-Fc	130
3.4.1 Изучение фармакокинетики B11-Fc.....	130
3.4.2 Исследование острой токсичности и местного раздражающего действия препарата B11-Fc.....	133
3.4.3 Исследование токсичности и местной токсичности при многократном введении препарата B11-Fc крысам.....	135
3.4.4 Исследование токсичности и местно-раздражающего действия при многократном введении препарата B11-Fc кроликам.....	145
3.4.5 Исследование иммунотоксических свойств антитела B11-Fc	146
3.4.6 Исследование аллергизирующих свойств антитела B11-Fc.....	149
3.5 Клинические исследования безопасности кандидатного препарата на основе модифицированного однодоменного антитела B11-Fc.....	150
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	154
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	165
ВЫВОДЫ	166
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	168
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	173
БЛАГОДАРНОСТИ	190

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Ботулинические токсины (BoNT) являются опасными природными токсинами, продуцируемыми бактериями рода *Clostridium*. Попадание BoNT в организм человека даже в небольших количествах ($> 0,5$ нг/кг) вызывает ботулизм – тяжелое заболевание, характеризующееся острым, симметричным нисходящим вялым параличом. С клинической точки зрения, такая интоксикация является неотложным случаем, для которого требуется своевременная диагностика и ранняя терапия.

Ботулизм может протекать в различных формах, в зависимости от пути проникновения; различают пищевой, младенческий, раневой, ятрогенный и ингаляционный ботулизм [12, 182]. Пищевой ботулизм является наиболее частой формой заболевания и возникает в результате попадания BoNT с пищей в организм [12]. Больные ботулизмом не способны к передаче заболевания между людьми и не требуют изоляции. Тем не менее, лица, подвергшиеся воздействию биологических жидкостей пациентов с ботулизмом, имеют повышенные риски заражения [12].

Известно семь типов ботулинических нейротоксинов (типы А–G), среди них типы А, В и Е (реже F) токсичны для человека, тогда как типы С и D в основном вызывают заболевания у животных [168].

Ежегодно в мире регистрируется около 1000 случаев ботулизма, 10% из которых являются летальными [85]. Каждый год в Российской Федерации регистрируется около 300 случаев ботулизма, что соответствует показателю заболеваемости в 0,15 на 100 тыс. населения. Количество летальных исходов имеет тенденцию к увеличению и достигает 26 случаев в год [4]. Несмотря на то, что ботулизм является хорошо описанным заболеванием с известной клинической картиной, его ранняя диагностика затруднена из-за относительно редкой встречаемости, а также симптомов, схожих с другими заболеваниями. Вследствие этого имеются сложности с началом ранней терапии и экстренной профилактики существующими средствами.

Высокому риску пищевой интоксикации ВоNT подвергаются люди, употребляющие рыбу, овощи, грибы, сыры и домашнюю консервированную или ферментированную пищу. Риск ятрогенного ботулизма несут косметологические и другие процедуры, связанные с введением ВоNT по медицинским показаниям. Употребление инъекционных наркотических средств повышает риск раневого ботулизма. Кроме того, люди, работающие с ВоNT в медицинских и научных учреждениях, военнослужащие, употребляющие консервированные продукты, а также возможные биотеррорестические атаки с применением аэрозольной формы ВоNT увеличивают риск возникновения ботулизма.

Одним из основных методов терапии ботулизма является антитоксическая терапия, направленная на нейтрализацию несвязанных, свободно циркулирующих токсинов. Данный метод используется при возникновении подозрения на интоксикацию ВоNT. Однако при использовании существующих антитоксинов клинические симптомы могут прогрессировать до 12 часов после начала терапии [68].

Антитоксин лошадиного происхождения с 1970 г. является универсальным доступным средством терапии ботулизма. На сегодняшний день его эффективность хорошо описана в экспериментальных исследованиях на животных. Эффективность препарата на людях показана в ретроспективных исследованиях и клиническом опыте [45]. Было показано, что раннее введение антитоксина (в течение 24 ч после интоксикации) более эффективно предотвращает прогрессирование неврологических симптомов и сокращает продолжительность искусственной вентиляции легких (ИВЛ) и время пребывания в реанимации [45]. Однако применение данного препарата может вызывать аллергические реакции, такие как гиперчувствительность и сывороточная болезнь (в 9–17%), анафилаксия (1,9%), и множество других побочных эффектов, связанных с использованием препарата, основным компонентом которого являются антитела лошадиного происхождения [25].

Существующие методы лечения сывороточными препаратами, помимо наличия множества недостатков, не устраняют паралич, поскольку они

нейтрализуют еще не связанный токсин, находящийся вне нервных клеток. Следовательно, их эффективность связана с ранним введением. Кроме того, качество сывороточного препарата может подвергаться существенным вариациям от партии к партии. Таким образом, актуальной задачей является разработка эффективных антитоксинов против BoNT в форме нейтрализующих моноклональных антител (мАт), которые могут представлять собой более безопасный и эффективный терапевтический препарат.

В течение последних двух десятилетий было описано множество разработок новых терапевтических препаратов на основе моноклональных антител [13, 178, 185]. мАт имеют значительные перспективы для повышения эффективности нейтрализации. Кроме того, моноклональные антитела могут быть получены в неограниченном количестве, и не будут иметь риска большого числа аллергических реакций или других побочных эффектов.

На сегодняшний день существует несколько препаратов против различных токсинов, например, препараты актоксумаб и безлотоксумаб, специфичные к токсинам бактерий *Clostridium difficile*, однако пока не существует ни одного препарата моноклональных антител против BoNT, находящихся на стадии клинических исследований [56]. Несмотря на это, многие разрабатываемые моноклональные антитела против различных токсинов, в том числе против BoNT, показали многообещающие результаты в доклинических исследованиях [160].

Однодоменные антитела для терапии различных заболеваний являются перспективным средством для лечения, поскольку обладают повышенной стабильностью, сниженной иммуногенностью в сравнении с классическими иммуноглобулинами, способностью связываться с труднодоступными эпитопами, а также проникать через гематоэнцефалический барьер [156, 3]. Однако недостатком однодоменных антител является низкая длительность циркуляции. Использование различных модификаций антител, например, связывание с человеческим Fc-фрагментом (в результате чего антитело становится состоящим только из тяжелых цепей), позволяет улучшить фармакокинетические параметры антитела и обеспечить эффекторные функции в организме [123, 61].

В связи с этим, отсутствие безопасных и эффективных методов терапии и экстренной профилактики ботулизма делает актуальной разработку такого средства на основе однодоменных антител, которое позволит обеспечить эффективную защиту в режимах терапии и экстренной профилактики.

Целью данной работы являлось создание кандидатного препарата на основе однодоменного антитела, специфичного к ботулиническому токсину типа А, и изучение возможности его применения для экстренной профилактики и терапии ботулизма.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1. Разработать технологию и получить кандидатный препарат на основе модифицированного однодоменного антитела, специфичного к ботулиническому токсину типа А;

2. Определить физико-химические и иммунологические характеристики получаемого препарата на основе модифицированного однодоменного антитела, специфичного к ботулиническому токсину типа А;

3. Оценить эффективность применения полученного кандидатного препарата на основе модифицированного однодоменного антитела для терапии и экстренной профилактики ботулизма на моделях введения ботулинического токсина типа А лабораторным животным;

4. Определить профиль безопасности полученного препарата на основе модифицированного однодоменного антитела, специфичного к ботулиническому токсину типа А, в доклинических исследованиях и клинических исследованиях I фазы.

Научная новизна выполненной работы

Впервые на основе модифицированного однодоменного антитела В11-Fc был создан кандидатный препарат для терапии и экстренной профилактики ботулизма, вызванного ботулотоксином типа А, а также были изучены его физико-химические и иммунологические характеристики.

Впервые была разработана технология получения кандидатного препарата на основе модифицированного однодоменного антитела В11-Fc. Впервые была получена клеточная линия СНО, стабильно продуцирующая модифицированное однодоменное антитело В11-Fc, а также отработаны условия ее культивирования. Была разработана технология хроматографической очистки модифицированного однодоменного антитела В11-Fc, включающая аффинную, анионообменную и мультимодальную хроматографию. Были подтверждены высокая частота и подлинность полученного препарата.

Впервые, в результате доклинических исследований и клинических исследований I фазы была продемонстрирована безопасность и возможность применения кандидатного препарата на основе модифицированного однодоменного антитела В11-Fc для терапии и экстренной профилактики ботулизма, вызванного ботулотоксином А.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования заключается в расширении знаний в области разработки методов терапии и профилактики ботулизма. В частности, была продемонстрирована возможность использования однодоменных антител для создания средств терапии и профилактики интоксикации ботулиническим токсином типа А.

Практическая значимость работы заключается в создании кандидатного препарата для терапии и экстренной профилактики ботулизма, вызываемого ботулиническим токсином типа А, разработке технологии его получения, а также проведении доклинических исследований его эффективности и безопасности. По результатам проведенных доклинических исследований собран пакет документов для проведения клинических исследований. Практическая значимость подтверждена патентом RU 2766348 С1 от 29.07.2021 (Однодоменное антитело и его модификации, специфически связывающиеся с ботулиническим нейротоксином типа А, и способ их применения для терапии или экстренной профилактики интоксикации, вызванной ботулиническим нейротоксином типа А). Результаты работы были использованы при исследованиях, защищенных патентом

РФ на изобретение RU 2768044 С1 от 28.12.2021 (Экспрессионный вектор на основе аденоассоциированного вируса, обладающий защитными свойствами против интоксикации, вызванной ботулиническим нейротоксином типа А).

Внедрение полученных результатов в практику

Научная работа представляет собой законченный вид исследования, имеющий выраженную прикладную направленность. В рамках диссертационной работы был разработан метод измерения количественного содержания моноклональных и однодоменных антител в культуральной жидкости при культивировании трансфицированных эукариотических клеток с использованием биослойной интерферометрии. Данный метод внедрен на уровне института, что подтверждается соответствующим актом о внедрении результатов в практику. По основным научным положениям, выводам и рекомендациям научно-исследовательской работы были внедрены лекции в учебный курс аспирантов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, что подтверждается соответствующим актом о внедрении. Получен патент РФ на изобретение RU 2766348 С1 от 29.07.2021 (Однодоменное антитело и его модификации, специфически связывающиеся с ботулиническим нейротоксином типа А, и способ их применения для терапии или экстренной профилактики интоксикации, вызванной ботулиническим нейротоксином типа А). Результаты работы были использованы при исследованиях, защищенных патентом РФ на изобретение RU 2768044 С1 от 28.12.2021 (Экспрессионный вектор на основе аденоассоциированного вируса, обладающий защитными свойствами против интоксикации, вызванной ботулиническим нейротоксином типа А).

Методология и методы исследования

В работе использовались методологические подходы, основанные на современных теоретических и практических исследованиях по получению препаратов рекомбинантных однодоменных антител; подходы, основанные на анализе и интерпретации полученных данных экспериментальных исследований. В работе были использованы современные иммунологические, биотехнологические,

молекулярно-биологические, бактериологические, биоинформатические и статистические методы, а также методы работы с лабораторными животными.

Положения, выносимые на защиту

1. Создан кандидатный препарат на основе модифицированного Fc-фрагментом однодоменного антитела B11-Fc для терапии и экстренной профилактики ботулизма, вызванного ботулотоксином типа А. Изучены физико-химические и иммунологические характеристики созданного препарата, а также подтверждена его эффективность в различных режимах применения;

2. Разработана технология получения кандидатного препарата на основе модифицированного однодоменного антитела B11-Fc, позволяющая получать препарат с чистотой до 99%;

3. В доклинических исследованиях и клинических исследованиях I фазы продемонстрировано, что полученный кандидатный препарат на основе модифицированного однодоменного антитела B11-Fc характеризуется безопасностью, хорошей переносимостью, и может быть использован для экстренной профилактики и терапии ботулизма, вызванного ботулиническим токсином типа А.

Степень достоверности

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием современных методик, высокой воспроизводимостью результатов, что подтверждалось статистической обработкой данных. Сравнение групп проводилось с использованием критерия Краскела-Уоллиса. Попарное сравнение экспериментальных групп с контрольными проводилось с использованием критерия Даннета. Минимальный уровень значимости составлял 5% ($p < 0,05$). Обсуждение результатов проводилось с учетом актуальных данных по данной тематике.

Апробация результатов

Результаты диссертационной работы были доложены на IX Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания»

(Сочи, 2022), I Российском конгрессе по медицинской микробиологии и инфектологии (Москва, 2023), X Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (Сочи, 2023), II Российском конгрессе по медицинской микробиологии и инфектологии (Москва, 2024).

Апробация диссертации состоялась 07 июля 2023 года на совместной научной конференции отдела медицинской микробиологии, отдела генетики и молекулярной биологии бактерий, отдела иммунологии и отдела Государственной коллекции вирусов Центра ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Протокол № 2).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК и/или индексируемых в системах Web of Science, Scopus, 2 тезиса докладов в сборниках материалов российских и международных конференций, получены 2 патента РФ на изобретение.

Личный вклад автора

Автор лично получил генетическую конструкцию, кодирующую модифицированное однодоменное антитело B11-Fc, специфичное к ботулиническому токсину типа А, получил стабильную клеточную линию, продуцирующую антитело B11-Fc, исследовал ее генетическую стабильность, создал систему банков стабильного продуцента, оптимизировал процесс его культивирования, отработал стадии аффинной и анионообменной хроматографической очистки антитела B11-Fc, охарактеризовал чистоту и специфическую активность препарата, измерил показатели аффинности взаимодействия антитела с разными классами Fc-рецепторов, изучил возможность Fc-зависимой активации комплемента, провел изучение эффективности антитела B11-Fc на моделях острой внутрибрюшинной и внутрижелудочной интоксикации мышей, подобрал эффективные дозы антитела, оценил защитную активность

антитела в различных режимах применения и против различных доз ботулинического токсина А, проанализировал и обобщил полученные результаты.

Получение ботулинического токсина типа А проводилось совместно с д.б.н., в.н.с. А.Н. Носковым, руководителем группы клостридиозов, и к.б.н., с.н.с. И.Д. Виноградовой лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России. Разработка лабораторной технологии получения кандидатного препарата проводилась совместно с м.н.с. Рябовой Е.И. Получение препарата для I фазы клинических исследований проводилось совместно с технологом Филиала «Медгамал» Полянским Д.С. и главным технологом Филиала «Медгамал» к.б.н. Карповым А.П. Доклинические исследования безопасности антитела были проведены совместно с центром доклинических исследований ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России. Клинические исследования безопасности были проведены совместно с ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 190 страницах машинописного текста и включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений и список используемой литературы (222 источника: 9 – отечественных и 213 – иностранных публикаций). Работа содержит 22 таблиц и 40 рисунков.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ботулизм

1.1.1 Этиология

Ботулизм – это тяжелое заболевание человека и животных, возникающее в результате системного действия токсина нейропаралитического действия, продуцируемого грамположительными, спорообразующими, облигатными анаэробными бактериями *Clostridium botulinum* (атипичные штаммы бактерий *Clostridium butyricum* и *Clostridium baratii* также способны продуцировать ботулинические токсины (BoNT) различных типов) [36, 183]. *C.botulinum* представляет собой гетерогенный вид бактерий, который разделяется на четыре фенотипические группы (группы I, II, III и IV) на основе физиологических характеристик. *C.botulinum* I и II групп чаще всего являются причиной ботулизма у человека [101, 60]; III группа вызывает заболевание у различных видов животных [191]; IV группа бактерий не вызывает ботулизм у животных и человека [37, 201] (Таблица 1).

Таблица 1 – Классификация фенотипических групп бактерий *C.botulinum* и тип продуцируемого ботулинического токсина

Группы бактерий	Типы ботулинического токсина
I (протеолитические)	A, B и F
II (непротеолитические)	B, E и F
III	C и D
IV	G

C.botulinum образует термостойкие споры, которые прорастают в анаэробных условиях при наличии богатого питательными веществами субстрата, после чего превращаются в бациллы, продуцирующие BoNT [188, 99].

Помимо анаэробных условий, для прорастания спор требуется низкая кислотность ($\text{pH} > 4,5$), низкое содержание соли и сахара, температура ($3\text{ }^{\circ}\text{C} - 37\text{ }^{\circ}\text{C}$), в зависимости от серотипа [166].

Ботулинический токсин считается самым летальным из известных токсинов из-за его высокой активности со смертельной дозой от 1 нг до 3 нг токсина на 1 кг массы тела [159].

Существует 6 форм ботулизма в зависимости от пути интоксикации: пищевой, раневой, младенческий, ингаляционный, а также кишечная колонизация у взрослых [192]. Младенческий ботулизм — это инфекция, связанная с размножением бактерии и образованием BoNT в кишечнике; раневой ботулизм связан с размножением бактерии и образованием BoNT в ране. Пищевой ботулизм — интоксикация, вызванная употреблением уже образованного в пище BoNT. Пищевая форма ботулизма в основном связана с употреблением консервированных или ферментированных овощей, мяса или рыбы, домашних продуктов из фасоли, колбасы, хлопьев и любыми мясными продуктами [192, 162, 184, 167, 216, 84].

1.1.2 Эпидемиология

С 1973 года Центры по контролю и профилактике заболеваний (CDC) поддерживают Национальную систему наблюдения за ботулизмом для отслеживания числа случаев интоксикации в Соединенных Штатах. За 5 лет с 2014 по 2018 год в среднем регистрировалось 198 случаев ботулизма в год. Соотношение каждого типа ботулизма варьировались от 67% до 80% для младенческого ботулизма, от 7% до 20% для ботулизма пищевого происхождения, от 8% до 25% для раневого ботулизма и от 1% до 4% для ботулизма другого или неизвестного происхождения [27-31]. За исключением редких крупных вспышек (например, на вспышку пищевого ботулизма в Огайо в апреле 2015 г. приходилось только 27 случаев) общее число случаев ботулизма и относительные доли каждого типа ботулизма оставались относительно стабильными в течение последних 10 лет.

Каждый год в Российской Федерации регистрируется около 300 случаев ботулизма, что соответствует показателю заболеваемости в 0,15 случаев на 100 тыс.

населения. Количество летальных исходов имеет тенденцию к увеличению и достигает 26 случаев в год [4]. Распределение заболеваемости ботулизмом в различных регионах России неравномерно. Есть данные о значительном превышении официальной статистики числа случаев интоксикации [9]. Например, в Волгоградской области наблюдалось увеличение уровня заболеваемости ботулизмом в 3 раза на основании сведений об инфекционных и паразитарных заболеваниях Управления Роспотребнадзора: общее число пострадавших за период 2015—2018 гг. составило 67, из которых 7 (10,4%) случаев летальны [5].

В Москве в период с 2016 по 2017 гг. был зарегистрирован 21 случай ботулизма; в Санкт-Петербурге в 2017 году произошла вспышка ботулизма, связанная с употреблением в пищу рыбы промышленного производства, которая привела к нескольким летальным исходам [9].

Кроме того, за последние десятилетия сообщалось о нескольких случаях использования *BoNT* в террористических целях [41]. Самый известный пример был совершен японской террористической организацией Аум синрикё, которая трижды использовала аэрозольный *BoNT* в общественных местах Токио в период с апреля 1990 г. по март 1995 г. Токсин получали путем выделения бактерии *C.botulinum* из образцов почвы [41].

В Бельгии в 1897 г. сообщалось о первом выделении штамма *C.botulinum* после вспышки пищевого ботулизма, связанной с употреблением соленой ветчины [207]. В настоящее время пищевой ботулизм по-прежнему остается основным видом ботулизма у человека. Ботулизм пищевого происхождения имеет высокую летальность и встречается во всем мире [42]. До 1950 года 60% случаев ботулизма заканчивались смертью. Позже смертность снизилась до <10% благодаря использованию антитоксических сывороток и оказанию интенсивной поддерживающей терапии [106]. Анализируя более свежие данные, в США в 2016 г. зарегистрировано 205 подтвержденных случаев интоксикации ботулизмом, 14% из которых были связаны с ботулизмом пищевого происхождения [157].

В Европе заболеваемость ботулизмом составляет около 200 случаев в год (0,03 случая на 100 000 человек). Самый высокий уровень заболеваемости за

последние 10 лет зарегистрирован в Польше и Литве [80]. Во Франции в 2015 г. было зарегистрировано 3 случая ботулизма, связанных с употреблением соуса Болоньезе в ресторане, и один случай был связан с развитием бактерии *C.baratii* в мясном фарше. В Словакии BoNT (тип A) (BoNT/A) был обнаружен в трех продуктах из хумуса [33]. Греция является страной с самой низкой заболеваемостью ботулизмом в Европе: Национальная организация общественного здравоохранения (ЕОДΥ) Греции не выявила случаев ботулизма пищевого происхождения за последние годы [79].

1.1.3 Патофизиология

Всего идентифицировано семь типов ботулинических токсинов (А, В, С, D, Е, F и G), которые были обнаружены в течение 1919–1970 гг. [192]. Большинство штаммов *C.botulinum* продуцируют только один тип токсина, хотя были идентифицированы штаммы, продуцирующие два типа токсинов [146]. Все типы BoNT имеют сходную структуру, состоящую из одной легкой цепи (цинк-зависимая эндопептидаза) (молекулярный вес 50 кДа) и одной тяжелой цепи (молекулярный вес 100 кДа), соединенных друг с другом одной дисульфидной связью (Рисунок 1).

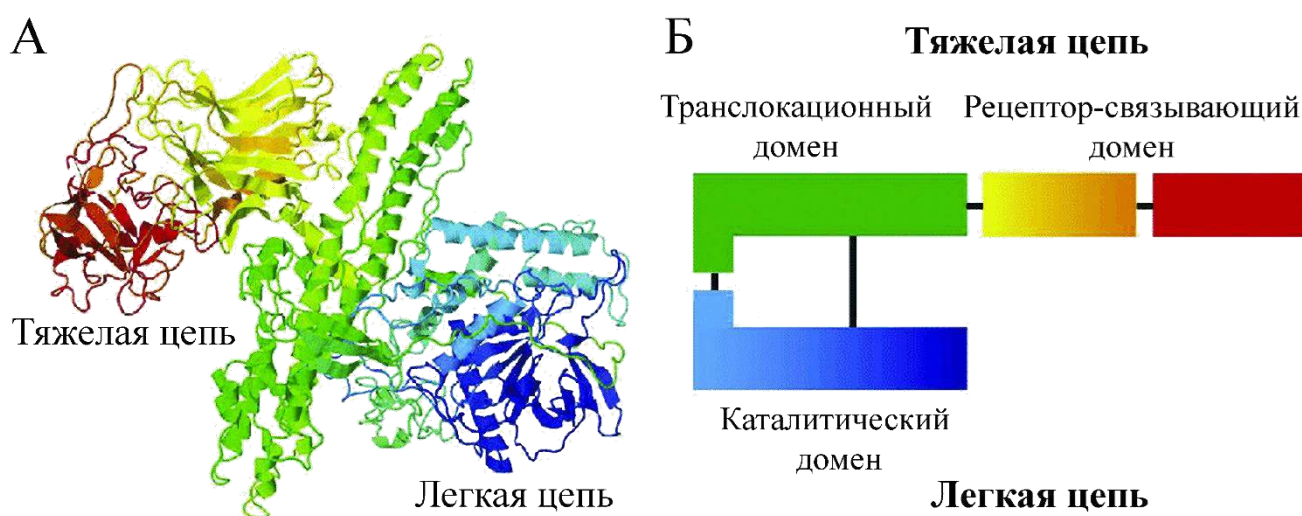


Рисунок 1 – Структура молекулы BoNT/A (А) и схематичное изображение его структуры с указанием основных доменов (Б). Адаптировано из [135].

Легкая цепь представляет собой активную часть, которая взаимодействует с одним из транспортных белков (SNARE) и препятствует высвобождению ацетилхолина, что приводит к нарушению передачи нервного импульса. Тяжелая цепь обладает высоким сродством к определенным рецепторам на пресинаптической мембране, обеспечивая быстрое и специфическое связывание ВоNT с рецепторами на плазматической мембране холинергических аксонов. Это позволяет токсину эффективно блокировать передачу нервных импульсов, вызывая неврологические симптомы.

Всего известно 5 подтипов ВоNT. Эти подтипы секретируются бактерией в виде комплексов, связанных с нетоксичными компонентами (нетоксичными нейротоксин-ассоциированными белками, NAP). Три формы комплексов ВоNT: токсин 12S, токсин 16S и токсин 19S являются основными формами в культурах бактерий. Токсин 12S состоит из ВоNT и нетоксичного негемагглютинина (NTNH). Токсин 16S состоит из ВоNT, NTNH и многочисленных белков гемагглютинина (НА). Токсин 19S имеет те же компоненты, что и токсин 16S, и предположительно представляет собой димер двух токсинов 16S, объединенных одним из белков НА. Штамм *C.botulinum* типа А (А1) способен продуцировать токсины 12S, 16S и 19S. Штаммы типа В, С и D – токсины 16S и 12S. Штаммы типа А2, Е и F выделяют только токсин 12S. Штамм типа G секретирует только 16S (Рисунок 2).

ВоNT попадает в кровеносную систему и транспортируется к окончаниям периферических холинергических нервов, включая нервно-мышечные соединения, окончания постганглионарных парасимпатических нервов и периферические ганглии [105]. Все типы токсинов вызывают сходный клинический синдром паралича черепно-мозговых нервов с последующим нисходящим симметричным вялым параличом различной степени тяжести [165].

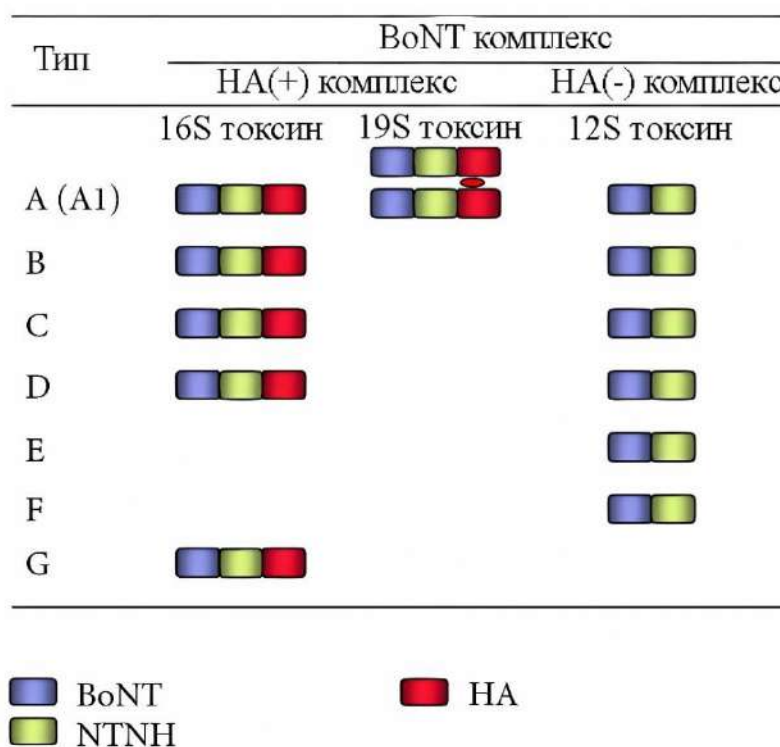


Рисунок 2 – Характеристики комплексов BoNT типов А-Г. Адаптировано из [87].

Механизм действия BoNT в нервно-мышечном синапсе включает связывание тяжелой цепи с нервной клеткой с последующей интернализацией посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, перемещением в цитозоль и расщеплением белков SNARE (SNAP-25, VAMP или синтаксин), участвующих в слиянии ацетилхолин-содержащих везикул с пресинаптической мембраной [166]. Вялый паралич возникает в результате блокирования передачи ацетилхолина через нервно-мышечные соединения путем ингибирования высвобождения ацетилхолина из пресинаптических окончаний мотонейронов [105]. Большой молекулярный размер BoNT, вероятно, препятствует его проникновению через гематоэнцефалический барьер в центральную нервную систему [166]. Ботулинический токсин может транспортироваться в центральную нервную систему аксонным транспортом, подобно столбнячному токсину, хотя прямого воздействия на центральную нервную систему у людей не зарегистрировано [35]. Восстановление паралича происходит после прорастания новых нервных окончаний.

Токсины серотипов А, В, Е и (реже) F вызывают ботулизм у человека. Токсин типа А вызывает наиболее тяжелый синдром с наибольшей долей пациентов, которым требуется искусственная вентиляция легких [48]. Токсин типа В обычно вызывает более легкое заболевание, чем тип А [48]. Сообщалось только о двух случаях заболевания людей от токсина типа С и одной вспышке, вызванной токсином типа D, все в 1950-х годах [67, 163]. Хотя токсин типа С блокирует нервно-мышечную передачу в тканях человека в лабораторных экспериментах, этот тип токсина не может всасываться в желудочно-кишечном тракте человека [49, 77]. Также сообщалось, что токсин типа D не блокирует нервно-мышечную передачу [49]. О случаях заболевания людей токсином типа G не сообщалось. Интоксикация токсином типа Е, обычно связанная с употреблением в пищу продуктов водного происхождения, вызывает ботулизм различной степени тяжести, который часто включает желудочно-кишечные симптомы [175]. Случаи ботулизма типом F редки и характеризуются быстрым прогрессированием, обширным параличом и дыхательной недостаточностью, но с более ранним выздоровлением [193].

1.1.4 Токсикокинетика

Продолжительность симптомов зависит от дозы токсина, скоростью его элиминации и регенерации расщепленных полипептидных компонентов комплекса SNARE. Полулетальная доза (LD_{50}) BoNT составляет от 1 нг/кг до 3 нг/кг массы тела. Меньшие дозы воздействуют на меньшее количество компонентов SNARE и выводятся быстрее. Период полувыведения ($T_{1/2}$) токсина у человека неизвестен, однако мышинная модель интоксикации BoNT/A, введенного парентерально, продемонстрировала $T_{1/2}$ приблизительно 230 мин [170].

Элиминация BoNT из крови усиливается введением антитоксической сыворотки. После связывания с антитоксином BoNT секвестрируется в печени и в селезенке [170]. Время до введения антитоксина существенно влияет на клиническое течение. В исследовании младенческого ботулизма у не получавших антитоксин детей была значительно более длительная продолжительность

искусственной вентиляции легких (2,4 недели по сравнению с 0,7 недели), госпитализаций (5,7 недели по сравнению с 2,6 недели) и кормления через зонд (10 недель по сравнению с 3,6 недели) по сравнению с получавшими лечение младенцами [75].

Восстановление белков SNARE необходимо для возобновления нормального высвобождения ацетилхолина, что частично связано с полипептидными мишенями различных типов ВоNT. Исследование, в котором сравнивается активность ботулинического токсина типа А и типа В, выявило значительно более длительное время восстановления целевого белка ВоNT/А – SNAP-25 [159].

1.1.5 Симптоматика

Типичными симптомами интоксикации являются вялый мышечный паралич, затуманенное зрение, за которым следует острый симметричный нисходящий двусторонний паралич, в результате чего, в случае отсутствия терапии, возникает паралич дыхательных или сердечных мышц. Если тяжелые случаи не приводят к летальному исходу, то полное выздоровление может занять месяцы или годы.

Первичными симптомами ботулизма обычно являются трудности со зрением (затуманенное зрение или двоение в глазах), дисфагия и сухость во рту. Эти симптомы могут являться следствием симметричного вялого паралича [32]. Также симптомы могут включать тошноту, рвоту, боль в животе и диарею [173]. Лихорадки не наблюдается, если не возникают инфекционные осложнения [173]. После появления неврологической симптоматики часто возникают запоры. Симптомы обычно возникают в течение 12-36 часов после воздействия токсина [32, 173, 42]. Паралич дыхательных мышц может привести к дыхательной недостаточности и смерти в течение 3 дней, если не проводится поддерживающая терапия [32, 173]. Таким образом, смерть может наступить в период от 20 часов до 1 недели после употребления подозрительной пищи.

1.1.6 Терапия и профилактика

Поддержка жизнеспособности организма с использованием ИВЛ может быть необходима в течение 2-8 недель после наступления дыхательной недостаточности, хотя сообщалось о случаях необходимости вентиляции легких в течение более длительного периода [26].

Помимо поддерживающей терапии ботулизма, может применяться введение ботулинического антитоксина. Раннее введение антитоксина может уменьшить степень и тяжесть паралича; в некоторых случаях может предотвратить паралич дыхания, а в других случаях - сократить продолжительность ИВЛ [47, 166]. Назначение антибиотиков не показано при пищевом ботулизме [173, 26]. Антитоксин замедляет прогрессирование паралича и уменьшает его продолжительность. Его применение является эффективным при введении менее, чем через 24 часа после появления симптомов, поскольку он нейтрализует только те молекулы токсина, которые еще не связаны с нервными окончаниями [142]. Однако использование существующего антитоксина лошадиного происхождения имеет множество побочных эффектов, включая анафилаксию, различные реакции гиперчувствительности и сывороточную болезнь [142].

На сегодняшний день в Европе чаще всего используется семивалентная лошадиная антитоксическая сыворотка (НВАТ). Препарат содержит фрагменты IgG, специфичные против семи типов BoNT, полученных из лошадиной сыворотки, состоящей из <2% интактных IgG и $\geq 90\%$ фрагментов Fab или F(ab')₂ (бивалентная форма Fab) иммуноглобулина для снижения реакций гиперчувствительности. Однако Fab и F(ab')₂ выводятся из кровотока быстрее, чем интактные IgG, что сокращает период полувыведения НВАТ из плазмы и может потребовать дополнительных введений при ботулизме или длительном воздействии BoNT [81].

Кроме того, существует метод терапии, связанный с введением очищенных терапевтических антител человека. Препарат BabyBIG применяется для лечения младенческого ботулизма и не используется для терапии ботулизма у взрослых. Данный препарат был снят с производства и будет заменен новым препаратом,

находящимся на стадии клинических исследований [15]. Другие препараты для терапии интоксикации ВоNT различных типов представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Препараты поликлональных антител и сыворотки, применяемые для лечения и экстренной профилактики ботулизма

Название	Тип ботулинического токсина	Производитель
ВАТ-АВ и ВАТ-Е	А, В и Е	Sanofi Pasteur (Франция)
Семивалентный лошадиный антитоксин (НВАТ)	А–G	Cangene Corporation (США)
Трехвалентный лошадиный антитоксин	А, В, Е	Behring (Германия)
Трехвалентный лошадиный антитоксин	А, В, Е	Biomed (Польша)
Трехвалентный лошадиный антитоксин	А, В, Е	Instituto Butantan (Бразилия)
Бивалентный лошадиный антитоксин EqВА	А, В	Argentina Public Department of Health (Аргентина)
Четырехвалентный лошадиный антитоксин	А, В, Е, F	Chiba Serum (Япония)
Иммуноглобулин человека (Baby-BIG)	А, В	California Department of Public Health (США)

Профилактика заболеваемости ботулизмом имеет высокую актуальность и должна начинаться с правильной обработки и хранения продуктов, а именно – создания неблагоприятной среды для развития *C.botulinum*. Для этого можно использовать закисление рН путем добавления уксусной и других кислот, обработку продуктов при высокой температуре и давлении, хранении при низких

температурах и т.п. Однако даже самые эффективные меры обработки продуктов не всегда могут обеспечить полное отсутствие заболеваемости.

В качестве специфической профилактики ботулизма для лиц с повышенным риском интоксикации ВоNT (работники в лабораториях, исследовательских и производственных учреждениях, которые работают с ботулиническим токсином или нейротоксин-продуцирующими видами *Clostridium*, а также военнослужащие) ранее использовали пятивалентный ботулинический анатоксин, иммунизация которым началась с 1965 г. Однако со временем было отмечено снижение его эффективности и увеличение числа умеренных местных реакций, связанных с ежегодной бустерной иммунизацией [180], что в дальнейшем привело к изменению схемы ежегодной ревакцинации на ревакцинацию только при снижении титров антител. Снижение иммуногенности могло быть связано с возрастом препарата анатоксина (> 30 лет). Проведенный CDC обзор нежелательных явлений после 3125 инъекций показал увеличение умеренных местных реакций у тех, кто получал бустерную вакцину с 12,4% в 2005 г. до 31,0% в 2010 г. Увеличение частоты тяжелых местных реакций не наблюдалось. Увеличение количества умеренных местных реакций могло быть результатом восстановления ежегодной бустерной терапии в 2004 г. Кроме того, исследования показали, что люди, получавшие анатоксин по-прежнему подвержены интоксикации ВоNT/A [179]. Поэтому, несмотря на то что проводили применение анатоксина после описания его потенциального профилактического действия, на основании данных о снижении иммуногенности, уменьшении эффективности продукта, увеличении частоты побочных реакций в месте инъекции и возрасте продукта CDC больше не распространяет пятивалентный анатоксин после 30 ноября 2011 года.

Поэтому, на сегодняшний день не существует одобренной вакцины для профилактики ботулизма. Однако в настоящее время существует множество направлений создания препарата для эффективной иммунизации:

- 1) *ДНК-вакцины*. Вакцинация препаратом на основе ДНК защищала мышей от внутрибрюшинной интоксикации ВоNT/A, при этом защита коррелировала с продукцией защитных антител [55]. Эти исследования внесли

вклад в разработку ДНК-вакцинации для нейтрализации действия токсина, исходя из простоты и безопасности ее производства. Такие плазмидные ДНК стабильны, что позволяет распространять их с ограниченными условиями хранения. Однако плазмидная вакцинация может потребовать многократного введения для выявления защитных титров антител [55].

2) *Вирусные векторы.* Аденовирусы имеют линейный двухцепочечный геном ДНК размером 36–38 т.п.н. Существует множество серотипов аденовирусов человека [130], из которых использовали неспособный к репликации AdHu5 (человеческий серотип 5) в качестве вектора вирусной вакцины. Вектор AdHu5, лишенный E1 области и кодирующий целевой ген [49, 221], использовался для иммунизации мышей внутримышечно (доза 2×10^7 БОЕ). Вакцинированные мыши выжили после введения 100 LD₅₀ BoNT/A спустя семь недель после вакцинации [221]. Аналогичные эксперименты проводились при интраназальном [217] или внутрижелудочном [49] введении и дали результат в виде аналогичной защиты от интоксикации BoNT. Следует отметить, что интраназальная вакцинация давала ответ IgA в дополнение к ответу IgG.

3) *Рекомбинантные вакцины.* Исследователи разработали препарат рецептор-связывающего домена BoNT/A, экспрессирующегося в *E.coli*. Мыши, иммунизированные препаратом, показали гуморальный ответ на антиген, который был способен частично защищать мышей от интоксикации BoNT/A в дозе 1200 LD₅₀ [129]. Эти исследования продемонстрировали возможность получения иммуногенной части ботулинического токсина, используемого в качестве кандидатной вакцины на основе рекомбинантного белка.

1.2 Моноклональные антитела

Существующие методы терапии интоксикации поликлональным антитоксином, полученным от иммунизированных людей или лошадей, имеют описанные ранее недостатки. Кроме того, они не способны полностью устранять паралич, поскольку нейтрализуют токсин вне нервных клеток, следовательно, их эффективность связана с ранним введением. Таким образом, актуальной задачей

является разработка эффективного антитоксина против ВоNT в форме нейтрализующих моноклональных антител (мАт), которые могут представлять собой более безопасный терапевтический препарат без высокого риска аллергических реакций и сывороточной болезни.

В 1975 г. Мильштейн и Келер опубликовали работу [121] по гибридной технологии, с помощью которой стало возможным получать мышинные мАт [121, 196]. С тех пор появилась возможность использовать мышинные антитела для создания химерных и гуманизированных мАт, а также получать полностью человеческие мАт [76, 138], что обуславливает сниженную иммуногенность препаратов на их основе (Рисунок 3).

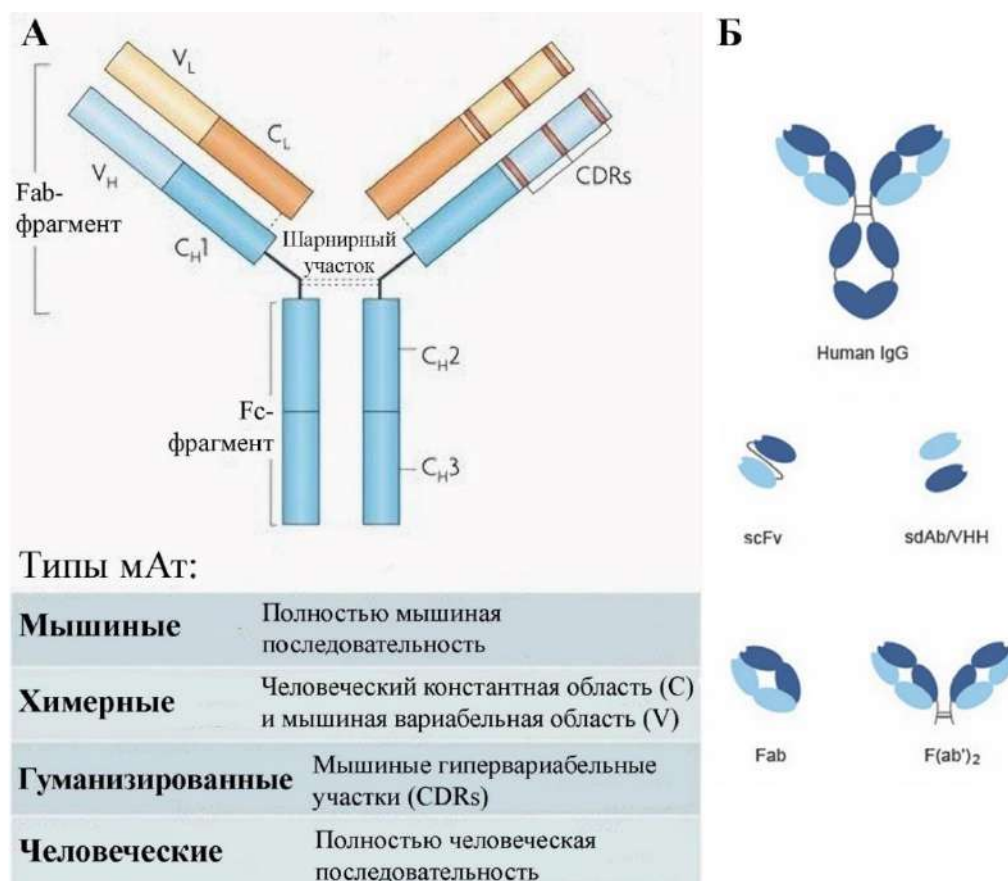


Рисунок 3 – Схематичное изображение структуры антитела IgG и описание типов мАт различной степени гуманизации (А); виды рекомбинантных антител (Б). Подстрочный символ «L» обозначает принадлежность к легкой цепи антитела, символ «H» - к тяжелой. Символами «C» и «V» обозначены константные и

вариабельные домены соответственно. Цифры от 1 до 3 соответствуют порядковому номеру соответствующих доменов. Адаптировано из [93].

Среди преимуществ терапевтических средств на основе мАТ выделяется их высокая специфичность, которая способствует направленному нейтрализующему действию [131]. Однако существующие побочные эффекты мАТ связаны со специфической мишенью или механизмом действия [203].

Антитела действуют посредством различных механизмов [141] (Рисунок 4): во время связывания Fab-фрагмента антитела с антигеном, оно снижает эффективное взаимодействие антигена с мишенью. Эти функции могут быть независимыми от Fc-фрагмента молекулы (хотя взаимодействие Fc-фрагмента с другими молекулами может усилить эти механизмы) или зависимыми (описано в разделе «1.3.1. Механизм нейтрализации токсинов моноклональными антителами и роль Fc-фрагмента в эффективной нейтрализации»). Кроме того, области константного домена тяжелой цепи (CH2 и CH3) Fc-фрагмента иммуноглобулина G (IgG) взаимодействуют с неонатальным рецептором Fc (FcRn), участвующим в транспорте IgG через клеточные барьеры и регулировании уровня циркулирующих антител, тем самым увеличивая их период полувыведения [220]. Специфичность этих функций зависит от изотипа антитела и его способности к вовлечению эффекторных клеток. IgG1 является наиболее часто используемым подклассом Ig для достижения цитотоксического эффекта. В тех случаях, когда цитотоксичность нежелательна, обычно используют IgG4, поскольку его Fc-фрагмент плохо индуцирует антителозависимую или зависимую от комплемента цитотоксичность. Также модифицирование Fc-области (например, путем дегликозилирования) приводит к еще меньшему вовлечению эффекторных клеток. Препарат омализумаб (Xolair; Genentech, Novartis) представляет собой гуманизированное мАТ на основе IgE для лечения тяжелой формы аллергической астмы, который специфически воздействует на свободный и мембраносвязанный IgE в организме, однако не воздействует на IgE, связывающийся с Fc-рецепторами на тучных клетках, и, таким образом, не вызывает дегрануляцию тучных клеток [46].

При разработке терапевтических мАТ важен выбор подкласса IgG. Говоря о терапии, IgG1 обладает максимальным потенциалом антителозависимой цитотоксичности и поэтому идеально подходит, например, для противоопухолевых препаратов. Напротив, IgG3 редко используется для терапевтических мАТ, поскольку его длинная шарнирная область склонна к расщеплению протеазами, что вызывает уменьшение времени полувыведения из организма [96]. Подкласс мАТ IgG4 обладает потенциалом активировать воспалительные реакции при помощи взаимодействия с Fc-рецепторами [103].

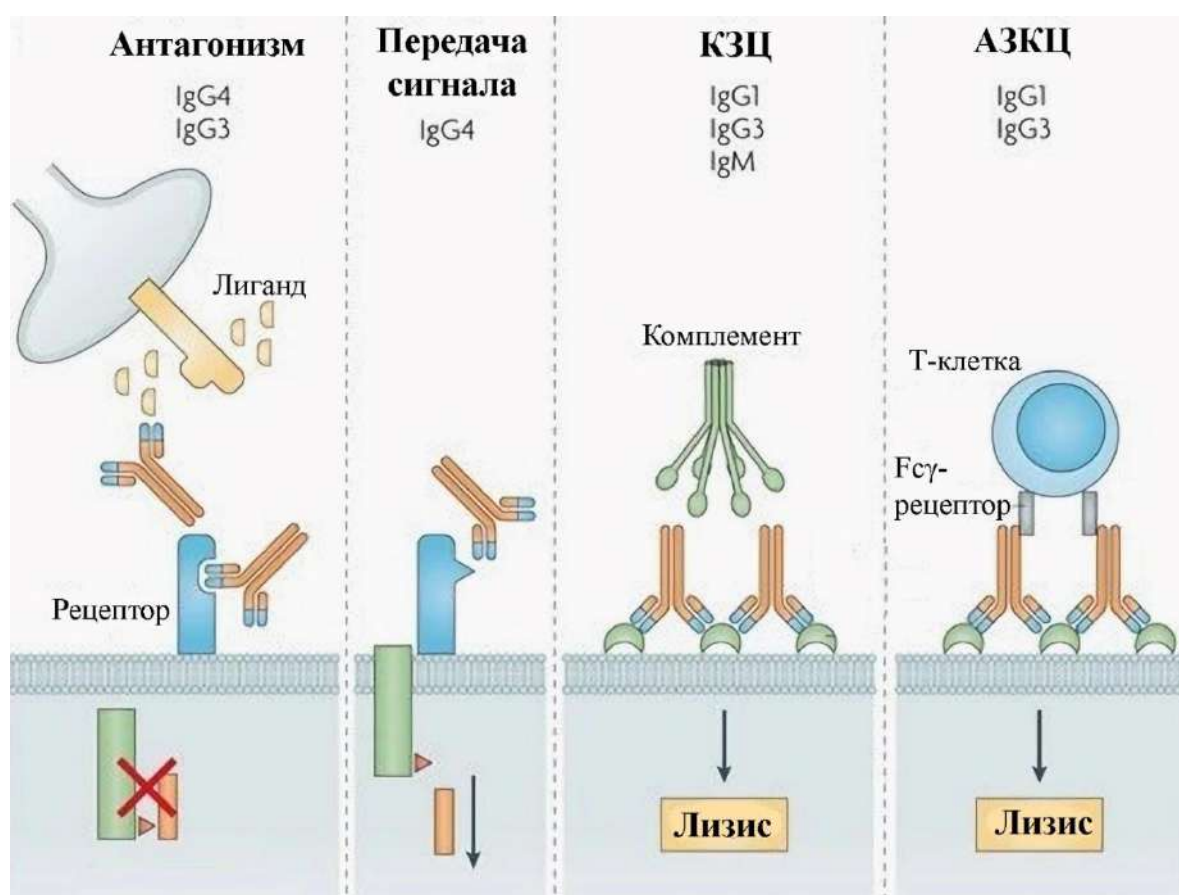


Рисунок 4 – Схематичное изображение механизмов действия некоторых из основных функций антител. КЗЦ – комплемент-зависимая цитотоксичность, АЗКЦ – антителозависимая клеточная цитотоксичность. Адаптировано из [93].

Кроме этого, гликозилирование Fc-фрагмента IgG мАТ необходимо для активации некоторых эффекторных функций антител, и для получения конкретных гликоформ антител можно использовать методы клеточной инженерии [107].

Функциональная активность мАТ зависит от иммуноопосредованных эффекторных функций, включая антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) и комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ). В эффекторной активности, опосредованной КЗЦ, связывание комплемента С1q со специфическим сайтом на Fc-фрагменте имеет решающее значение для инициации каскада комплемента, что в конечном итоге приводит к лизису клетки-мишени [108]. При АЗКЦ-опосредованной активности Fc-часть мАТ связывается с FcγR на эффекторной клетке, такой как моноцит, макрофаг или натуральный киллер, тогда как Fab-фрагменты связываются с рецепторами клеточной поверхности на клетке-мишени. Это приводит к разрушению клетки-мишени либо путем поглощения клетки за счет фагоцитарной активности иммунной клетки, либо высвобождения цитокинов [108]. Важнейшим фактором возможности мАТ вызывать АЗКЦ или КЗЦ является его аффинность к FcγR и С1q соответственно, которая определяется углеводными (гликановыми) цепями в аминокислоте Asn297 в домене CH2 Fc-фрагмента (Рисунок 5) [172, 114, 2].

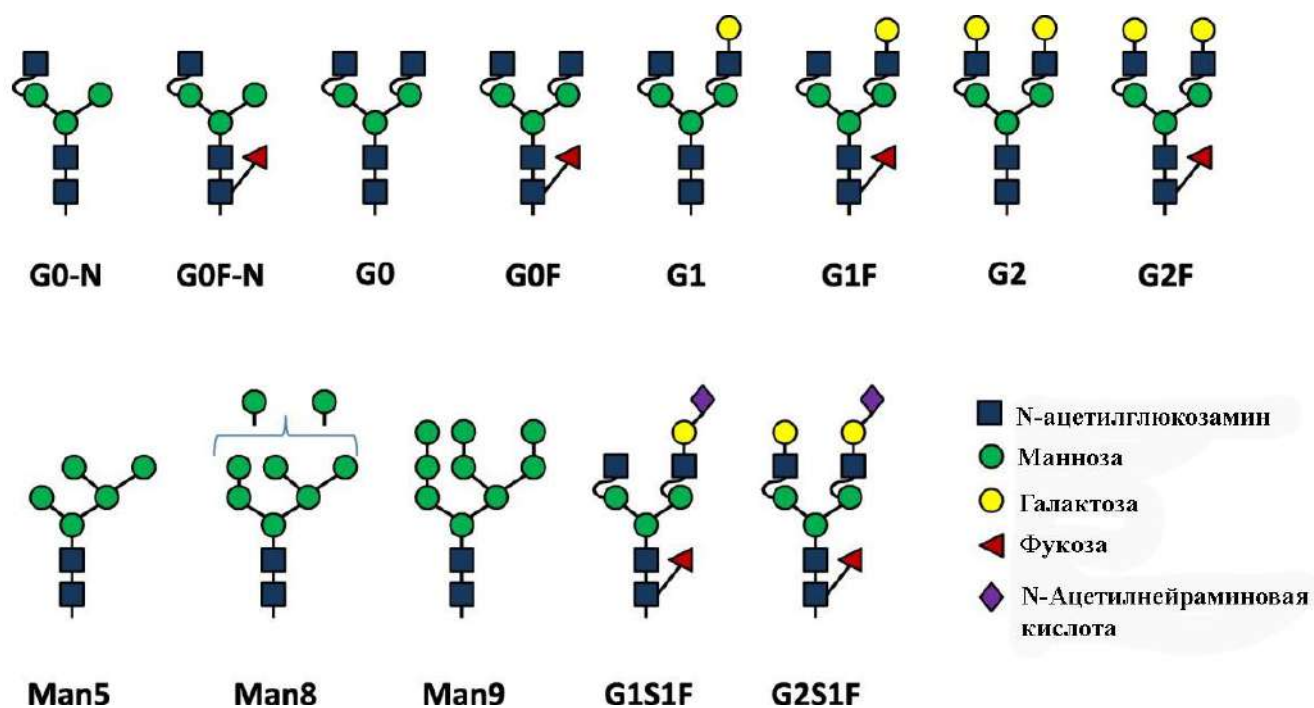


Рисунок 5 – Часто встречающиеся структуры N-гликанов в Fc-фрагменте моноклональных антител. Адаптировано из [181].

Среди разных мАт, и даже внутри одного препарата, может существовать множество разных гликановых профилей. Первоначально продаваемая форма трастузумаба (герцептин) имеет восемь различных изоформ с различными гликановыми цепями, содержащимися в определенных соотношениях в препарате [111]. Различные гликановые цепи определяют различия в фармакодинамике и фармакокинетике разных мАт. Афукозилирование (т.е. отсутствие фукозы, связанной с N-ацетилглюкозамином, присоединенным к Asn297 Fc домена), например, приводит к резкому усилению АЗКЦ из-за повышенной аффинности связывания FcγR IIIa без каких-либо изменений в КЗЦ [218]. Использование только афукозилированных форм трастузумаба по сравнению с продаваемым препаратом трастузумаб, который содержит фукозилированные и нефукозилированные формы, не только повышает эффективность в исследованиях *in vivo* на модели опухоли, но также уменьшает период полувыведения с 13,1 до 10,1 дней, вероятно, из-за ускоренного удаления молекул трастузумаба через механизм АЗКЦ [111].

Было показано, что другие модели гликозилирования также влияют на фармакокинетику мАт: IgG, в котором отсутствует галактоза (гликоформы G0) IgG2 и потенциально IgG1, остается в сыворотке мышей на 20–40% дольше, чем мАт с другими гликоформами [158]. Возможным объяснением является более высокая аффинность связывания галактозилированных форм с FcγRI. Также, например, было отмечено в три раза более быстрое выведение для гликанов с высоким содержанием маннозы (Man5, Man8 и Man9) по сравнению с обычными сложными фукозилированными формами, что, вероятно, объясняется маннозным рецептором [115]. В целом, изменения клиренса, вызванные различными профилями гликозилирования, до сих пор исследуются и до конца не изучены [69].

1.2.1 Получение моноклональных антител

Для получения моноклональных антител чаще всего используются методы гибридомной технологии и фагового дисплея. Гибридомная технология была впервые использована для получения мАт в 1975 году Мильштейном и Келером [121]. Этот метод включает несколько этапов. Сначала мышей иммунизируют

специфическими антигенами, эмульгированными с соответствующим адъювантом. Бустерную инъекцию проводят через две недели, затем, когда в крови достигается достаточное количество антител, проводят эвтаназию мыши. Для определения достаточного количества антител проводят отбор крови и далее оценивают методами ИФА и проточной цитометрии. После эвтаназии препарируют селезенку, затем применяют ферментативное или механическое измельчение ткани, выделяя В-клетки. Чистые В-клетки получают с помощью центрифугирования в градиенте плотности [161].

Следующим шагом является слияние В-лимфоцитов и клеток миеломы. Перед слиянием клетки миеломы подготавливают путем культивирования с 8-азагуанином, что делает их чувствительными к среде с гипоксантин-аминоптерин-тимидином (НАТ). Процесс слияния осуществляют с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ), что приводит к слиянию клеточных мембран. После процесса слияния образуется множество клеток, включая слитые В-клетки с клетками миеломы, неслитые В-клетки, неслитые клетки миеломы, В-клетки, слитые с В-клетками, клетки миеломы, слитые с клетками миеломы. Следовательно, используют селективную среду, содержащую НАТ, для отбора только В-клеток, слитых с клетками миеломы [104]. Гипоксантин и тимидин являются метаболитами пути синтеза нуклеозидов. Таким образом, при использовании такой среды смогут выжить только те клетки, у которых есть необходимый фермент для синтеза нуклеиновых кислот, называемый гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазой (HGPRT). В неслитых клетках миеломы отсутствует HGPRT, поэтому они не могут осуществлять процесс репликации и не смогут расти в среде НАТ. Неслитые В-клетки имеют ограниченную продолжительность жизни и поэтому также не смогут осуществлять деление. Следовательно, только слитые В-клетки и клетки миеломы – гибридомы – способны расти в селективной среде. Следует отметить, что путь синтеза нуклеиновых кислот *de novo* также ингибируется из-за присутствия аминоптерина в среде НАТ [161, 104].

Для получения моноклонов-продуцентов антител разбавленную смесь клеток помещают в лунки 96-луночного планшета, в лунках которых присутствуют мышинные макрофаги или фидерные фиброциты, обеспечивающие ростовые факторы, необходимые для гибридомных клеток. Затем оценивают антигенсвязывающую способность секретируемых антител различными клонами гибридом с помощью ИФА. Слитые гибридомы и полученные мАт можно хранить в жидком азоте [161].

Этот процесс может хорошо подходить для получения терапевтических антител, однако при использовании этого метода возникают некоторые серьезные проблемы. Получение достаточного количества мАт с помощью клеток гибридомы занимает от 3 до 6 месяцев. Использование терапевтических мышинных антител, полученных с помощью гибридомной технологии, имеет некоторые ограничения из-за различий между иммунной системой человека и грызунов, вследствие чего вводимые в организм мышинные антитела будут являться высокоиммуногенными. Обычно это приводит к неэффективности лечения, за исключением некоторых особых случаев [23]. Мышинные антитела обладают умеренным эффектом стимуляции цитотоксичности [6]. Таким образом, их постоянное введение в организм человека часто приводит к аллергическим реакциям и анафилактическому шоку в результате продукции человеческих антимышинных антител (НАМА), которые атакуют введенные мышинные мАт и, в свою очередь, стимулируют аллергическую реакцию [14, 134]. Препарат на основе мАт против CD3 мышинного происхождения (ОКТ-3) были первым терапевтическим мАт, одобренным для клинического применения в медицине. Тем не менее, мАт оказались неэффективными при терапии отторжения трансплантата, в первую очередь потому, что они вызывают у пациентов тяжелый иммунный ответ НАМА [128]. Чтобы свести к минимуму иммуногенные эффекты мышинных терапевтических мАт, мышинные иммуногенные области антител удаляются с помощью различных подходов [174]. Эта проблема была решена путем разработки методов инженерии антител, направленных на получение менее иммуногенных химерных или гуманизированных антител. В настоящее время, полностью

гуманизированные антитела получают в моделях трансгенных мышей (например, HuMabMouse и XenoMouse) с использованием гибридной технологии. С этой целью, локусы генов иммуноглобулина мыши были заменены локусами человека в геноме трансгенной мыши [161].

Метод фагового дисплея является одной из альтернатив традиционной гибридной технологии получения моноклональных антител. Процесс получения начинается с создания библиотеки антител. Продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL) лигируют в вектор для фагового дисплея (фагмида). мРНК, выделенная из мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC), подвергается обратной транскрипции в кДНК. Полученный пул генов областей VH и VL цепей затем амплифицируют с использованием специфических праймеров [186, 140].

Библиотеки антител обычно подвергают скринингу с помощью повторяющихся циклов селекции. Этот метод был разработан в 1985 году Джорджем П. Смитом, который продемонстрировал, что интересующий пептид может быть представлен на поверхности нитчатых фагов после вставки фрагмента ДНК в ген белка оболочки фага. Затем был разработан процесс, известный как «пэннинг или биопэннинг» – процесс селекции и обогащения по аффинности с целью выделения комплексов пептид-фаг на основе их специфической аффинности связывания. Технология фагового дисплея была впервые использована МакКафферти и Винтером для создания антиген-специфических мАт путем создания библиотек антител на нитчатых фагах [126]. Этот метод основан на интеграции последовательности гена, кодирующего конкретное антитело, в последовательность ДНК нитчатого бактериофага, что приводит к экспрессии интересующего белка на поверхности капсида бактериофага. Такие фаговые библиотеки могут быть получены от здоровых доноров (наивные библиотеки) или людей, которые являются носителями определенного заболевания или иммунизированных определенным антигеном (иммунизированные библиотеки). Фаг M13 представляет собой нитевидный бактериофаг, который широко

используется для продукции антител посредством фагового дисплея. Этот фаг заражает различные штаммы *E.coli*.

Изучение фрагментов рекомбинантных антител, таких как Fv (вариабельная область, состоящая из VH и VL), Fab, одноцепочечных вариабельных доменов (scFv) и двухвалентных scFv, сыграло важную роль в развитии технологии фагового дисплея антител [126, 66]. По сравнению с каноническими антителами, эти фрагменты имеют лучшую экспрессию в бактериях. Фрагменты антител можно клонировать в бактериофаг (рядом с белком оболочки, известным как белок РIII) с использованием вектора, после чего бактериофаги используются для заражения *E.coli* и создания фаговой библиотеки. Такая технология обеспечивает быстрое получение антител без использования животных, а также позволяет легко проводить скрининг большого разнообразия клонов. Однако у него есть некоторые недостатки, такие как более высокая стоимость и сложность метода [126, 66].

Достижения в области молекулярной биологии привели к разработке эффективных методов модификации генов *in vitro* и последующей экспрессии этих последовательностей в культурах клеток млекопитающих, бактерий или грибов. Это дало возможность модификации мышинных мАт путем частичной замены фрагмента мышинового антитела соответствующей последовательностью человеческого антитела. Таким образом, общая иммуногенность мАт снижается, не влияя на эффективность нейтрализации эпитопов [34]. Гуманизированные антитела становятся все более актуальными для терапии воспалительных и онкологических заболеваний, при этом множество препаратов на основе антител доступны на рынке, а также проходят клинические испытания [160].

Химерные антитела представляют собой особые типы терапевтических антител, созданные путем комбинации последовательностей антител человека и животных (мышей). Их получают путем модификации константных и вариабельных областей антител мыши [136]. Эти антитела на 65% состоят из последовательностей человеческих антител с целью уменьшения риска нежелательных реакций на чужеродные антитела. Некоторые препараты на основе химерных антител были одобрены для использования в терапии. Номенклатура для

наименования химерных мАТ заканчивается суффиксом «ксимаб», например, инфликсимаб, ритуксимаб, абциксимаб [144].

Гуманизированные мАТ считаются лучшими терапевтическими антителами из-за их безопасности *in vivo*. Молекулы таких антител почти на 95% имеют человеческое происхождение. Иногда они имеют сниженную эффективность в сравнении с исходными мышиными моноклональными антителами в отношении связывания с антигенами [43]. Примерами одобренных для терапии гуманизированных антител являются даклизумаб, омализумаб, алемтузумаб [94].

Получение мАТ человека обычными гибридомными методами затруднено из-за сложностей поддержания иммортализованных клеточных линий и гибридом человека в культуре. Также невозможно проводить иммунизацию людей *in vivo* многими антигенами, в сравнении с животными моделями [23]. Однако некоторые способы получения мАТ человека стали возможными благодаря экспрессии фрагментов антител в бактериях. Точно так же фрагменты антител можно экспрессировать на нитчатых бактериофагах для скрининга библиотек антител [195, 149]. Создание полностью человеческих мАТ служит более безопасной альтернативой модификации мышиных мАТ. Большинство таких препаратов было создано с использованием метода фагового дисплея, который является хорошо зарекомендовавшим себя и наиболее широко используемым методом для разработки препаратов антител человека [194]. Использование трансгенных мышей, содержащих иммуноглобулины человека, является альтернативным способом получения мАТ человека. В результате иммунизации трансгенных мышей можно получать гибридомы, продуцирующие человеческие антитела. В 2003 году был создан первый препарат адалимумаб (Хумира) использующий в своем составе полностью человеческое мАТ, применяемое для лечения ревматоидного артрита [11]. Адалимумаб и панитумумаб входят в число полностью человеческих терапевтических мАТ; множество других препаратов находятся на различных стадиях клинических испытаний.

1.2.2 Фармакокинетика моноклональных антител

Распределение мАт зависит от скорости проникновения в ткани и распределения в интерстициальном пространстве, связывания антител с поверхностями клеток и элиминации из ткани, внутриклеточного поглощения и деградации. Распределение мАт может происходить посредством трех основных процессов: пассивной диффузии, переноса с током крови и трансцитоза через клетки сосудистого эпителия. Из-за физико-химических свойств и большого размера мАт пассивная диффузия не играет существенной роли в процессе распределения. Основным механизмом распространения мАт в ткани является перенос с током крови [18]. Он определяется проникновением потока жидкости из сосудов в ткани, обусловленным гидростатическими силами, а также проникновением через парацеллюлярные поры в сосудистом эпителии [18, 86, 59]. Эффективность проникновения определяется размером, извилистостью и количеством пор, а также размером, формой и зарядом мАт [18, 59]. Принцип переноса заключается в разнице между гидростатическим и онкотическим (коллоидно-осмотическим) давлением, что способствует эффективному проникновению мАт [150]. Трансцитоз через эпителиальные клетки сосудов, опосредованный через неонатальный Fc-рецептор, может быть еще одним эффективным путем распределения мАт, особенно в тканях, в которых распределение током крови ограничено [58]. Несколько исследований показали двунаправленный транспорт IgG как в базолатеральном к апикальному, так и в апикально-базолатеральном направлениях [73, 54]. Это указывает на то, что FcRn-опосредованный трансцитоз может играть важную роль в распределении мАт из сосудистого пространства в ткани.

После этого, распределение антител через интерстициальное пространство зависит от диффузии и сродства к антигенам-мишеням на поверхностях клеток. В случаях, когда мишень для связывания мАт отсутствует или находится в плазме, распределение в тканях будет ограничено. Для антител соотношение их концентраций в ткани и крови (ткань:кровь) должно находиться в диапазоне 0,1–0,5 (т. е. концентрация мАт в тканевой интерстициальной жидкости ниже, чем в плазме

крови) [119]. В случаях, когда мАТ связывается с высоким сродством к внесосудистым участкам, соотношение концентраций ткань:кровь может быть намного выше [18, 113].

Антитела удаляются путем экскреции или вовлечения в катаболизм. В отличие от небольших молекул, мАТ велики для эффективной фильтрации почками, поэтому они не выводятся с мочой, за исключением патологических явлений [21]. Если все же фрагменты низкомолекулярных антител фильтруются, они обычно реабсорбируются и метаболизируются в проксимальных канальцах нефрона. Выделение с желчью составляет очень небольшую часть в элиминации антител IgG. Таким образом, их элиминация осуществляется главным образом с помощью внутриклеточного катаболизма, где путем лизосомальной деградации происходит расщепление антител до аминокислот после поглощения пиноцитозом, неспецифическим эндоцитозом, либо рецептор-опосредованным эндоцитозом.

Рецептор-опосредованный эндоцитоз IgG возникает в результате взаимодействия рецепторов клеточной поверхности либо с Fc-доменом, либо с одним из Fab-связывающих доменов антитела. Такие связывания служат сигналом для интернализации молекулы IgG в везикулу и последующей лизосомальной деградации. Если связывания уменьшаются за счет взаимодействия CDR антител со специфической для мАТ мишенью, то процесс эндоцитоза и элиминации называется мишень-опосредованной диспозицией лекарственного средства (Target-mediated drug disposition (TMDD) [1]. Скорость элиминации антител через TMDD зависит от экспрессии рецептора-мишени (которая обычно ограничена), сродства мАТ к рецептору, дозы мАТ, скорости интернализации антитела и скорости катаболизма внутри клетки [181]. Важно отметить, что антитела, которые выводятся через TMDD, будут иметь дозозависимую нелинейную элиминацию. Из-за высокой специфичности связывания и аффинности мАТ к его мишени, TMDD является основным способом элиминации многих мАТ, особенно при низких дозах и концентрациях [181].

Пиноцитоз представляет собой неспецифический эндоцитоз эндотелиальными клетками, выстилающими кровеносные сосуды. Из-за большой

площади поверхности эндотелиальных клеток в организме ($> 1000 \text{ м}^2$) такой способ эффективно удаляет молекулы IgG из организма. Катаболическое расщепление IgG после захвата пиноцитозом не ограничивается конкретным органом, а происходит во всем организме. Таким образом, кожа, мышцы и желудочно-кишечный тракт являются основными органами элиминации молекул IgG, которые не подвергаются путям рецептор-опосредованной элиминации.

Поскольку внутриклеточное поглощение посредством пиноцитоза является неспецифическим, необходим защитный механизм для IgG, чтобы поддерживать их концентрацию в плазме для обеспечения длительного терапевтического действия. Такая защита может опосредоваться через FcRn. Механизм действия следующий [176]: IgG поглощается клетками посредством эндоцитоза с образованием эндосомы, содержащей FcRn. При физиологическом pH FcRn имеет низкое сродство к IgG, но по мере закисления эндосомы сродство FcRn увеличивается и позволяет IgG связываться через специфический сайт в домене Fc. После связывания комплекс FcRn-IgG возвращается на поверхность клетки и освобождает молекулу IgG от связывания после достижения физиологического pH. Белки в эндосомах, которые не связаны с FcRn, подвергаются протеолитической деградации в лизосомах. FcRn-опосредованная рециркуляция молекул IgG, включая терапевтические мАТ, защищает 2/3 попавших в эндосомы молекул IgG от катаболического расщепления [117]. Как следствие, период полувыведения IgG1, IgG2 и IgG4 составляет $\sim 18\text{--}21$ дней, что значительно дольше, чем период полувыведения других белков с аналогичной молекулярной массой [192]. Молекулы IgG3, которые имеют значительно более низкую аффинность связывания с FcRn, имеют период полувыведения 7 дней. Помимо того, что FcRn обеспечивает защиту антител, он также способствует трансцитозу мАТ в различных органах и тканях [122].

Эффективность опосредованной FcRn защиты от деградации была продемонстрирована на мышах с нокаутом FcRn, у которых период полувыведения IgG уменьшился в 10 раз [70]. Аналогичным образом, увеличение pH-зависимой аффинности связывания с FcRn посредством различных модификаций может еще

больше снизить период полувыведения IgG [70]. Несмотря на показанную эффективность защиты мАт FcRn, существует предел рабочих концентраций. При физиологических концентрациях IgG 12 мг/мл период полувыведения IgG составляет примерно 21 день. Введение высоких концентраций IgG экзогенно, в случае терапии высокими дозами внутривенного иммуноглобулина, либо эндогенно, при таких заболеваниях как множественная миелома, приведет к уменьшению периода полувыведения за счет высокой нагрузки для рециркуляции антител с помощью FcRn [109]. И наоборот, можно ожидать, что гипогаммаглобулинемия будет увеличивать период полувыведения терапевтических мАт. Однако значительные изменения в рециркуляции антител с помощью FcRn не выявляются при использовании терапевтических доз мАт поскольку чаще всего их применяют в дозах <10 мг/кг, что увеличивает общее количество IgG в организме всего на 1–2% [109].

мАт не обладают высокой биодоступностью при пероральном приеме из-за их большого размера, ограниченной проницаемости мембран и ограниченной стабильности по отношению к активности желудочно-кишечных протеаз [181]. Таким образом, наиболее распространенным способом введения является внутривенная инфузия, за которой следуют подкожная и внутримышечная инъекции. Подкожная инъекция используется для большинства мАт, которые не вводятся внутривенно. Подкожное распределение мАт происходит за счет процесса абсорбции из места инъекции, который в значительной степени зависит от транспорта мАт через интерстициальное пространство в лимфатическую систему.

Подобно процессам распределения мАт, поглощение молекул IgG в интерстициальное пространство после подкожной инъекции происходит с током лимфатической жидкости. Трансцитоз IgG с помощью FcRn происходит минимально [222]. Поскольку ток лимфатической жидкости в лимфатических сосудах очень медленный по сравнению с кровотоком в сосудах, процесс попадания мАт в большой круг кровообращения после подкожного введения происходит медленно, с замедленным повышением концентрации в плазме.

Максимальная концентрация (T_{max}) для мАт варьируется от 1,7 до 13,5 дней со средним значением около 6–8 дней [222].

Было показано, что на абсорбцию и биодоступность мАт влияют различные факторы. Место инъекции влияет на скорость и степень распределения мАт [148]. Это связано с изменениями градиента давления в интерстициальном пространстве в разных местах введения мАт, а также с объемом движения лимфы, который может изменяться из-за мышечных сокращений [124].

Специфическими для мАт факторами, влияющими на абсорбцию, являются заряд, размер и состав [112]. Суммарный заряд молекулы IgG изменяет характеристики поглощения лимфой. Из-за небольшого отрицательного заряда, присутствующего в интерстициальном пространстве, наибольшее поглощение наблюдается у отрицательно заряженных антител, а положительно заряженные молекулы поглощаются медленнее [170].

Специфическими характеристиками субъекта, которые могут влиять на распределение, являются масса тела, пол, возраст, уровень активности, иммунный статус, частота дыхания и артериальное давление [199]. Толщина гиподермы увеличивается с массой тела, уменьшается с возрастом и зависит от пола, что потенциально может привести к изменению функциональной активности и всасывания [89]. Например, поток лимфы увеличивается на 83% в течение 2 часов интенсивной двигательной активности, что может иметь существенное влияние на поступление терапевтических белков в системный кровоток [89]. Вследствие этих факторов существует значительная вариабельность скорости и степени абсорбции одного и того же мАт между разными молекулами и между разными людьми.

1.2.3 Однодоменные антитела

Открытие антител, состоящих только из тяжелых цепей (ТЦАт), у верблюдовых [92] стало началом в получении рекомбинантных однодоменных антител. Антигенсвязывающий домен этих специфических иммуноглобулинов – V_HH – представляет собой одиночный вариабельный домен с высокой аффинностью. Это свойство является следствием специфичности их

последовательности и структуры [64, 65]. Подобно варибельному домену канонических антител (VH), VHH верблюдовых содержат заметные различия в каркасных участках (FR) и гиперварибельных петлях. В классическом варианте VH FR2 состоит из четырех высококонсервативных гидрофобных аминокислот (Val37, Gly44, Leu45 и Trp47), которые в VHH заменены на более гидрофильные аминокислоты (Phe37, Glu44, Arg45 и Gly47) (Рисунок 6) [155]. Такая замена обуславливает лучшую растворимость, молекулярную и термодинамическую стабильности VHH, следовательно, VHH более устойчивы к химической денатурации и протеолизу (Таблица 3). Кроме того, они обладают более высокой стабильностью при крайних значениях pH или ионной силы [206]. Более высокая конформационная стабильность также связана с наличием дополнительной дисульфидной связи [110, 127, 132]. Также было показано, что из-за более высокой стабильности, повышение или понижение температуры таких антител не влияет на их конформацию [74].

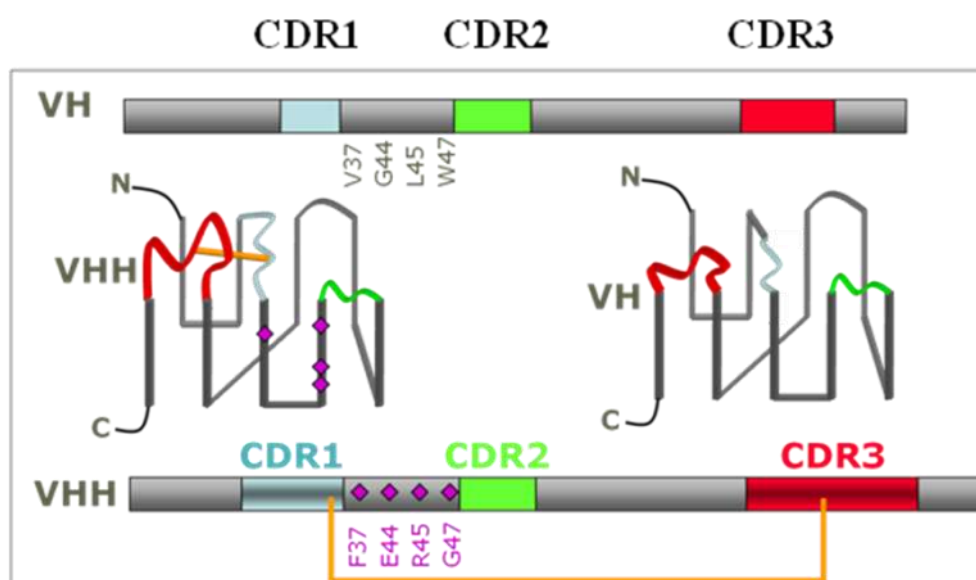


Рисунок 6 – Схематичное изображение различий между VH канонического антитела и VHH ТЦАТ. Заимствовано с сайта компании Caminnov.

Помимо описанного, домен CDR3 VHH свернут таким образом, чтобы обеспечить защиту аминокислот, которые закрыты варибельной областью VL в варианте канонического антитела [156]. Это объясняет повышенную

растворимость V_{HN} по сравнению с одиночным доменом V_H и scFv (одноцепочечным вариабельным фрагментом, который является слитыми вариабельными областями легкой (V_L) и тяжелой (V_H) цепей канонического антитела) [63]. В V_{HN} удлинение областей CDR1 и CDR3 обеспечивает увеличение поверхности, взаимодействующей с антигеном [156, 190]. Область CDR3 V_{HN} может эффективно взаимодействовать с эпитопами, которые почти недоступны для канонических антител [156, 190].

Кроме того, каноническое и V_{HN} антитело заметно различаются по размеру. Небольшой размер V_{HN} облегчает манипуляции с последовательностью V_{HN} [97], а наличие только трех антигенсвязывающих петель позволяет легко модифицировать их внутреннюю аффинность к антигену [98]. Однако, из-за почечной фильтрации и деградации меньший размер V_{HN} приводит к их короткому периоду полувыведения из организма [118]. Эта особенность может рассматриваться как положительное качество, поскольку она приводит к высокой проницаемости в ткани, и отрицательной, так как их молекулярная масса меньше размера пор в клубочках почечных телец (65 кДа), что затрудняет терапию, требующую циркуляцию антител в течение длительного периода времени. Это ограничение имеет несколько возможных вариантов продления периода полувыведения, например, слияние с молекулами полиэтиленгликоля, с длительно циркулирующими сывороточными белками (например, альбумином), или слияние с Fc-фрагментом IgG. Кроме того, слияние с Fc-фрагментом позволяет реализовывать FcRn-опосредованные функции антитела для увеличения времени циркуляции в организме (подробнее описано в разделе «1.3.1 Механизм нейтрализации токсинов моноклональными антителами и роль Fc-фрагмента в эффективной нейтрализации») [123].

Одним из существенных недостатков scFv является их происхождение от грызунов, поскольку их получение осуществляется гибридным методом. Мышиные V_L и V_H демонстрируют только 53% и 51% идентичности последовательностей с такими областями у человека [125], в то время как V_{HN}

демонстрируют сходство последовательностей с человеческими VH до ~75–90% идентичности, что делает однодоменные антитела низкоиммуногенными [209, 95].

Таблица 3 – Сравнение свойств одноцепочечного scFv и однодоменного VHH антител

Свойства	scFv	VHH антитела
Размер	30-35 кДа	12-15 кДа
Период полувыведения	< 1 ч	<< 1 ч
Растворимость в воде	+	+++
Агрегация	++	-
Стабильность	+	+++
Проникновение в ткани	+	++
Разнообразие паратопов	+	++
Неспецифическое связывание	++	+
Простота модифицирования для повышения аффинности	+	++
Простота получения	+	+++

В результате, процесс гуманизации VHH является более простым. После гуманизации scFv мышиноного происхождения переменные области могут вызывать антиидиотипический ответ, поскольку замена всех остатков в этой области может повлиять на связывание антигена [200]. Кроме того, разработка scFv для снижения выработки человеческих антител против мышинных антигенов [22] будет инактивировать [133] вводимые в организм scFv, что снизит их клиническую эффективность [214], а при повторном введении возникнут аллергические реакции [22, 133]. Кроме того, их гуманизация снижает аффинность связывания [116, 11].

Хотя scFv и однодоменные антитела обладают схожей аффинностью, VHH имеют большую авидность к эпитопам. VHH имеют лучший доступ к бороздкам и щелям на поверхности антигенов, таких как ионные каналы [61], вирусные гликопротеины [100] или иммунные синапсы [38]. Это объясняется более длинной

петлей CDR3, что позволяет улучшать доступ к скрытым эпитопам. VHH также проявляют хорошее сродство к нескрытым эпитопам. Кроме того, неспецифическое связывание у VHH ниже, чем у scFv [98].

Антитела, применяемые для терапии интоксикаций, должны иметь быструю диффузию и элиминацию комплексов антиген-антитело, чтобы обеспечить достаточную скорость нейтрализации токсина с высокой степенью проникновения в ткани [20], после чего они должны задерживаться почками в течение короткого периода времени. Таким образом, фрагменты антител, такие как VHH и scFv, подходят для инактивации токсинов, и scFv успешно применялись *in vitro*. В одном из исследований, нейтрализующий scFv-Fc ингибировал эндопептидазную активность ботулинического нейротоксина [152]. В другом исследовании scFv использовали для нейтрализации токсина скорпиона [102]. Однако эти фрагменты не были эффективны *in vivo* из-за их длительного периода полувыведения в организме [164]. Напротив, однодоменные антитела с меньшим размером и большей аффинностью связывания показали многообещающие результаты в инактивации токсинов *in vivo* [20]. Также VHH были эффективны против токсина скорпиона [102]. Все это подчеркивает потенциал VHH для использования в качестве терапевтических средств от интоксикаций.

1.3 Моноклональные антитела для терапии ботулизма

Использование антител в качестве терапевтических средств было предопределено задолго до разработки технологии получения мАТ: пассивная терапия, т.е. перенос антител из сыворотки иммунизированного человека или животного к неиммунизированному, впервые была продемонстрирована более 120 лет назад в эксперименте Беринга и Китасато, в котором специфическая сыворотка применялась для терапии дифтерии [53]. Сывороточная терапия обычно использовалась для лечения инфекционных заболеваний до открытия химиотерапии в 1930-х годах [39]. Несмотря на это, антибиотики имели более низкую стоимость, а также значительно меньше побочных эффектов и не имели узкой специфичности к патогену, вследствие чего отсутствовала необходимость

диагностики инфекции перед лечением. Таким образом, сывороточная терапия отошла на второй план. Однако появление полирезистентных форм новых и старых патогенов и увеличение населения с ослабленным иммунитетом во всем мире привели к возрождению в разработке терапевтических средств на основе антител для лечения и профилактики волны лекарственно-устойчивых инфекционных заболеваний [24]. Антимикробные препараты способны подавлять размножение бактерий, но не могут уничтожать уже сформированные ими токсины, поэтому специфические нейтрализующие антитела являются единственным средством, которое может нейтрализовать токсины [53]. Вследствие этого антитела остаются привлекательным средством для терапии и профилактики интоксикаций.

Тем не менее, современные терапевтические средства на основе поликлональных антител (пАт) имеют множество ограничений в использовании в связи с их иммуногенностью, описанной ранее. Поэтому, препараты на основе мАт являются более перспективными средствами терапии. Кроме этого, иммуногенность препаратов на основе мАт может быть снижена путем создания человеческих или гуманизированных антител, демонстрирующих снижение частоты побочных эффектов в сравнении с препаратами на основе пАт [52]. Гуманизация антител демонстрирует снижение иммуногенности и улучшение переносимости *in vivo* [94]. Кроме этого, человеческие или гуманизированные мАт показывают улучшенную фармакокинетику [94], что позволяет использовать сниженную дозу препарата и меньшую частоту введения.

Терапия на основе моноклональных антител имеет некоторые ограничения. Во-первых, моноклональные антитела являются высокоспецифичными к антигену, но высокая специфичность может ограничивать эффективность моноклонального антитела при случайном изменении его целевого эпитопа [72]. Во-вторых, эффективность мАт, особенно используемых для нейтрализации патогенов и токсинов, остается относительно низкой по сравнению с препаратами на основе пАт [72].

Во множестве исследований описывается разработка и оценка эффективности мышинных мАт против BoNT/A, B, E и F [83, 82, 88]. Однако эти

мАт специфичны только для некоторых типов ВоNT. В более позднем исследовании были получены высокоспецифичные нейтрализующие мАт против трех типов ботулинического токсина путем иммунизации мышей смесью НС-доменов ВоNT/A, В и Е. В результате был показан сильный синергический эффект, который усилил нейтрализующую активность до 400 раз, что может иметь высокий терапевтический потенциал [71].

Ранее, для создания терапевтических препаратов на основе антител, способных к нейтрализации ВоNT, исследователи получали антитела, специфичные только к НС-домену (тяжелой цепи) ВоNT. В 2008 году были опубликованы результаты оценки эффективности *in vitro* и *in vivo* полученных нейтрализующих антител, специфичных к LC-домену (легкой цепи) с помощью метода мышинной гибридомы [10]. Четыре антитела, специфичных к LC-домену ВоNT/A, продемонстрировали высокую нейтрализацию *in vivo* при применении отдельно и в смеси с антителом, специфичным к НС-домену, что подтвердило эффективность таких антител против ВоNT/A [10]. Также описаны механизмы действия таких антител [10]: 1) антитела блокируют проникновение токсина в нейроны; 2) они способствуют элиминации связанного комплекса из организма; 3) обеспечивают протекцию холинергических нейронов от действия ВоNT. Таким образом, антитела специфичные к LC могут обеспечивать три механизма защиты от ВоNT, которые теоретически являются основой эффективной терапии и профилактики интоксикаций.

Другие описываемые результаты исследований мАт, специфичных к ВоNT, показывают, что использование одного рекомбинантного антитела, которое связывается с токсином в двух различных местах, и второго мАт, также связывающих два эпитопа, способствует ускоренной элиминации комплекса из организма [154].

Антитела, нацеленные на протеолитический домен токсина, могут ингибировать протеолитическую активность токсина внутри клетки и, потенциально, предотвращать интоксикацию. Однако для этого антитела должны проникать внутрь клеток. Результаты исследования таких мАт были описаны ранее

[82], и было показано, что они могут предотвращать внутриклеточную активность токсина и облегчать паралич. Липосомальные средства доставки таких антител могут быть использованы для направленной доставки антител в мотонейроны [187].

Кроме этого, для эффективной нейтрализации BoNT используют однодоменные антитела (наноантитела, VHH). Такие антитела, состоящие из переменных доменов ТЦАт, выделенных у семейства верблюдовых (VHH), были получены путем экспрессии в хлоропластах зеленых водорослей [17]. Такие однодоменные антитела связываются с BoNT/A с такой же аффинностью, что и антитела верблюдовых, продуцируемые в *Escherichia coli*, и аналогичным образом защищают нейроны крысы от интоксикации BoNT/A [17]. VHH обладает способностью связываться с труднодоступными эпитопами, а также имеют преимущества для их получения в прокариотических и дрожжевых системах экспрессии. Однако, VHH специфичные к BoNT/E, экспрессировали в *Pichia pastoris* и было показано, что фолдинг белка в дрожжевой системе экспрессии улучшает связывание токсина в сравнении с прокариотической системой экспрессии [16].

Другое исследование VHH показало способность обеспечивать стабильность белка SNAP25 в нейронных клетках при его расщеплении BoNT/A [204]. Это доказывает преимущество использования VHH в качестве терапевтического и профилактического агента против интоксикации BoNT.

1.3.1 Механизм нейтрализации токсинов моноклональными антителами и роль Fc-фрагмента в эффективной нейтрализации

Гуморальный иммунный ответ на инфекционные агенты включает в себя ряд эффекторных механизмов антител, таких как прямое связывание со специфическими эпитопами и опосредованные антителами реакции, состоящие из антителозависимой клеточной цитотоксичности, антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ) и комплемент-зависимой цитотоксичности [197]. На протяжении долгого времени считалось, что нейтрализация токсинов

осуществляется антителами не с помощью опосредованных ими реакций, а с помощью прямого антителозависимого механизма, при котором антитела связываются с токсинами и препятствуют их взаимодействию с клетками-мишенями, тем самым предотвращая прикрепление токсина к клетке-мишени или нарушая его ферментативную активность. Теоретически, для того чтобы антитело взаимодействовало с токсином, требуется только вариабельная область антитела, поскольку она специфически распознает и связывается с эпитопом токсина. Таким образом, само по себе связывание обычно рассматривается как нейтрализация. Известно, что при взаимодействии с бактериями константная область (Fc-фрагмент) антитела выполняет эффекторные функции (АЗКЦ, АЗКФ, КЗЦ) [19, 171], но участие этих механизмов в гуморальном иммунном ответе против различных токсинов неясно.

Однако было показано, что скорость элиминации из организма комплексов антиген-антитело из печени пропорциональна размеру комплекса [202]. Следовательно, присоединение, например, небольших молекул VHH к токсину приведет к образованию небольших комплексов, которые будут медленнее выводиться из организма. Поэтому для ускорения выведения комплексов может быть эффективно применение модификации VHH Fc-фрагментом. Было показано, что крупные комплексы быстро удаляются ретикуло-эндотелиальной системой (системой фиксированных мононуклеарных фагоцитов) и циркулирующими лейкоцитами [72]. Как правило, элиминация антигена после поликлонального ответа происходит двумя путями, оба из которых задействуют Fc-рецепторы. Один из таких механизмов активируется связыванием с Fc γ -рецептором, а другой – системой комплемента [72]. Эти два механизма могут действовать независимо. Таким образом, считается, что Fc-опосредованная элиминация также играет важную роль в нейтрализации токсина [170].

Помимо этого, Fc-фрагмент играет важную роль в стабилизации молекулы антитела благодаря защите FcRn. Было показано, что регуляция уровней циркулирующих IgG у грызунов и высших видов животных происходит посредством строгого pH-зависимого связывания IgG/FcRn [62]. Считается, что

антитело, связанное с FcRn, защищено от деградации, что увеличивает время циркуляции IgG в сыворотке. Поэтому использование антител специфичных к токсинам, не содержащих Fc (таких как Fab, scFv и др.), демонстрирует более короткий период полувыведения [147].

Удаление иммуногенных Fc-фрагментов из препаратов лошадиных антитоксинов служит для снижения иммуногенности; тем не менее, такие препараты защищают от интоксикации ВоNT, не активируя Fc-опосредованные эффекторные функции. Можно предположить, что высокая концентрация таких антител компенсирует отсутствие Fc-опосредованных механизмов, и вызывает нейтрализацию токсина исключительно с помощью его блокирования. Вполне вероятно, что модификация лошадиного F(ab')₂ человеческим Fc-фрагментом повысит эффективность антитоксина и уменьшит общее количество антител, вводимых пациенту. Такие манипуляции невозможны для пАт, а также их оценка на животных моделях может быть затруднена из-за межвидовых различий в Fc-рецепторах и рецепторах комплемента. Однако, модификация Fc-фрагментом применима для мАт.

Множество исследований подтверждают участие Fc-фрагмента IgG в нейтрализации токсина. Vitale L и др. показали [210], что антитела F(ab')₂ были в 10-100 раз менее эффективны, чем полный IgG в нейтрализации токсина сибирской язвы *in vitro*, даже несмотря на то, что они сохраняли идентичную аффинность к токсину. Добавление антител, блокирующих Fc-рецептор, значительно снижало активность этого мАт, а также нейтрализующую активность мышинных, кроличьих и человеческих антитоксических сывороток. Однако *in vivo* более высокие концентрации антител F(ab')₂ защищали от действия токсина сибирской язвы. Таким образом, в естественных условиях защита не может однозначно описываться Fc-нейтрализующей активностью [211].

Кроме этого, исследователи оценивали [72] протективные свойства мАт на основе IgG и его формы F(ab')₂ у мышей, которые подвергались интоксикации ВоNT/A. Равные количества мАт на основе IgG и его фрагмента F(ab')₂ (50 пмоль/мышь) инкубировали с возрастающими количествами ВоNT/A в диапазоне

от 10 до 100 LD₅₀, после чего данные смеси вводили мышам. Антитела на основе IgG защищали 100% мышей от заражения 50 LD₅₀ BoNT/A, тогда как его форма F(ab')₂ защищала только от 10 LD₅₀ токсина [72]. Таким образом, нейтрализующая эффективность F(ab')₂ у мышей была в 5 раз ниже, чем у мАт в форме IgG, что свидетельствует о важной роли Fc в защите от интоксикаций ботулотоксином.

Таким образом, исходя из вышеизложенного можно заключить, что в связи с быстроразвивающимися симптомами и высокой летальностью при интоксикации ботулиническим токсином, при отсутствии безопасных и эффективных средств профилактики и терапии, разработка такого препарата является актуальной задачей. Поскольку однодоменные антитела благодаря своей структуре показали тенденцию к положительному влиянию при их применении против уже связанного токсина, а именно способности к обеспечению стабильности белка SNAP25 в нейронных клетках при его расщеплении BoNT/A [202], и предотвращению внутриклеточной активности токсина и облегчению паралича, использование для данной цели однодоменных антител теоретически обосновано. Из-за быстрого периода полувыведения таких антител, а также показанной защите от деградации антител с Fc-фрагментом, опосредованной FcRn [70], модификация однодоменных антител Fc-фрагментом IgG1 человека является необходимой.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 Лабораторные животные

Для доклинического изучения эффективности нейтрализации токсина полученными антителами использовали самок лабораторных мышей BALB/c (инбредные), полученных из Филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Вес мышей составлял 19-22 г. Работа с животными была утверждена комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России в соответствии с протоколами № 16 от 8 февраля 2019 года и № 11 от 25 июня 2021 года.

Для доклинического изучения острой токсичности препарата использовали аутбредных мышей (самки и самцы) весом 21-27 г, аутбредных крыс (самки и самцы) весом 210-270 г, полученных из Филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Работа с животными была утверждена на биоэтической комиссии АНО «ИМБИИТ» и одобрена для проведения (БЭК № 6/20 от 18.08.2020 г.).

Для доклинического изучения безопасности препарата использовали кроликов породы Шиншилла (самки и самцы) (Питомник «Манихино», Россия), крыс аутбредных SD (самки и самцы) (Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России), морских свинок альбиносов (самцы) (Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России), мышей линии CBAxС57В1/6 F1 (самцы) (Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России), CBA (самцы) (Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России), C57В1/6 (самцы) (Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). Работа с животными была утверждена Комиссией по биоэтике в соответствии с протоколом № 112 от 25 октября 2022 г.

Лабораторных животных, используемых в работе, содержали в соответствии с требованиями, установленными Санитарно-эпидемиологическими правилами и нормативами СП 2.2.1.3218-14 "Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)" от 29 августа 2014 года (№51). Кроме того, работу выполняли

в соответствии с ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Были соблюдены «Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» и «Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях» от 22 сентября 2010 года. Перед работой с лабораторными животными вода, подстилка, корм и клетки были предварительно стерилизованы. Доступ к корму и воде был свободным (*ad libitum*).

2.1.2 Клеточные линии и бактериальные штаммы

Для продукции антител использовали клетки линии СНО (клеточная линия, полученная из клеток яичника китайского хомяка). Клетки были получены из коллекции ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Для бактериальной трансформации в данной работе использовали лабораторный штамм DH5 α *Escherichia coli* (New England Biolabs, США). Для получения VoNT/A использовали штамм A98 *Clostridium Botulinum*, полученный из коллекции ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

2.1.3 Плазмидные векторы

Для оценки эффективности трансформации бактерий использовали плазмидную ДНК pBluescript II SK(+) любезно предоставленную м.н.с. лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России Довгим М.А. В качестве плазмиды, содержащей целевой ген, использовали pAL-TA-B11-Fc, синтезированную в ЗАО «Евроген» (Россия). В качестве контрольной плазмиды использовали pVACP-EGFP, любезно предоставленную м.н.с. лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России Довгим М.А.

2.1.4 Антитела и рекомбинантные белки

В работе использовали следующие антитела: поликлональные козы антитела с пероксидазной меткой (horseradish peroxidase – HRP), специфичные к Fc IgG человека (Anti-Human IgG (Fc specific)–Peroxidase antibody produced in goat) (Sigma, США), поликлональные IgG козы к IgG кролика с HRP меткой (Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, HRP-conjugate) (Sigma, США), IgG овцы к IgG человека с HRP меткой (NA933 Human IgG HRP Linked Whole Ab) (Sigma, США).

2.1.5 Реактивы для культуры эукариотических клеток

Для культивирования клеток использовали бессывороточные питательные среды TransFX-C (Cytiva, США), SFM4CHO (Cytiva, США). Культивирование клеток проводили с добавлением 5 мМ L-глутамина и смеси антибиотиков пенициллина (50 ЕД/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) (ПанЭко, Россия). Для образования трансфекционного комплекса использовали среду Opti-MEM I (Thermo Scientific, США). В качестве реагента для трансфекции использовали polyethylenimine (PEI) 25000 (Polysciences, США). Для окрашивания клеток и определения выживаемости использовали трипановый синий Trypan Blue Dye 0,4% фирмы Bio-Rad (США). Для селекции использовали антибиотик пуромицин фирмы InvivoGen (США). В качестве подпитки использовали питательный раствор CellBoost 5 (Cytiva, США). Для криоконсервирования использовали диметилсульфоксид (Sigma, США).

2.1.6 Микробиологические реактивы

Для работы с бактериальными культурами использовали среду 2xYT и ампициллин фирмы Sigma (США), бактериологический агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия).

2.1.7 Реактивы для молекулярной биологии

В работе использовали специфические эндонуклеазы рестрикции FastDigest, щелочную фосфатазу FastAP, буфер FastDigest Buffer (10x) и T4 ДНК-лигазу фирмы Thermo Scientific (США). Для выделения ДНК из геля использовали набор Cleanup Standart (Евроген, Россия). Препаративное выделение бактериальной ДНК проводили с помощью набора HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Scientific, США).

2.1.8 Материалы для очистки и фильтрации

Для гель-фильтрации BoNT/A использовали сорбент Sephacryl S-300 (Cytiva, США). Для анионообменной очистки BoNT/A использовали сорбент DEAE Sepharose (Cytiva, США). Аффинную очистку антител проводили с использованием сорбента MabSelect SuRe (Cytiva, США), анионообменную – с помощью мембранного адсорбера Sartobind Q Nano 3 мл (Sartorius, Германия), мультимодальную – с помощью керамического гидроксипатита СНТ Type I (Bio-Rad, США).

Для конечной фильтрации препарата использовали: Sartopore 2 0,2-0,1 мкм и Virosart CPV 200 см² (Sartorius, Германия), а также Corning 1L Filter System (Corning, США).

2.1.9 Материалы для анализа

Для анализа чистоты методом белкового электрофореза в полиакриламидном геле использовали коммерческие гели TGX Stain-Free (Bio-Rad, США).

Перенос белков для иммуноблоттинга проводили на нитроцеллюлозную мембрану Protran Premium 0.45 μm NC (Amersham, Cytiva, Швеция). Для визуализации использовали субстрат ECL Clarity (Bio-Rad, США).

Для оценки уровня экспрессии антител использовали набор для ИФА IgG общий-ИФА-БЕСТ (АО Вектор-Бест, Россия).

Для исследования банков клеток на микоплазмы выделение ДНК проводили с использованием набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США).

Для изучения наличия остаточной ДНК штамм-продуцента использовали набор resDNASEQ Quantitative CHO DNA Kit (Thermo Scientific, США). Для выделения ДНК использовали PrepSEQ Residual DNA Sample Preparation Kit (Thermo Scientific, США).

Для исследования наличия остаточного белка штамма-продуцента в препарате использовали набор CHO HCP ELISA Kit, 3G (F550-1) (Cygnus, США).

Для исследования наличия остаточного белка А в препарате использовали набор Protein A-H ELISA Kit (Human IgG) (F050H) (Cygnus, США).

Для изучения пирогенности использовали ЛАЛ-реактив Endosafe КТА и Контрольный стандарт эндотоксина (Charles River Endosafe, США), пробирки «Пиротест» 10x75 мм и вода для ЛАЛ-теста «Пиротест» (ЛАЛ-Центр, Россия).

В качестве субстрата для оценки хемилюминесценции при постановке иммуноферментного анализа (ИФА) использовали TMB Peroxidase EIA Substrate Kit (Bio-Rad, США).

2.1.10 Другие реагенты

В качестве контроля сравнения при исследовании протективности полученного антитела на мышах использовали сыворотку противоботулиническую типа А лошадиную (Микроген НПО, Россия).

Также в работе использовали следующие реагенты: о-Ксилол (ЭКОС-1, Россия), Эозин Y (Leica Biosystems, США), среда для заключения срезов Sub-X Mounting Medium (Leica Biosystems, США). Для приготовления буферных и других растворов использовали соли и реактивы фирм Sigma (США), Merck (Германия), Serva (Германия), Pharmacia (Швеция), Merck (Германия), Applichem (Германия, США), Диа-М (Россия), ПанЭко (Россия) и Реахим (Россия) степеней чистоты х.ч. и о.с.ч.

2.2 Оборудование

Результаты электрофорезов визуализировали путем проявления гелей с помощью Gel Doc EZ (Bio-Rad, США). Концентрацию ДНК и белков определяли при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Перенос белков для иммуноблоттинга проводили с помощью системы Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, США). Для визуализации результата иммуноблоттинга использовали анализатор Amersham Imager 600 (GE, США). Подсчет клеток осуществляли с помощью автоматического счетчика TC20 (Bio-Rad, США). Замороженные культуры эукариотических клеток хранили в криохранилище CY50945-70 (Thermo Scientific, США). Для биослойной интерферометрии использовали прибор Octet RED96 (Sartorius, Германия) и сенсоры с иммобилизованным белком A Protein A (Sartorius, Германия) и Ni-NTA (Sartorius, Германия). Хроматографическую очистку BoNT/A и антител проводили с помощью хроматографических систем АКТА Start и АКТА Pure 25 (Cytiva, США). Концентрирование препаратов проводили с использованием установки тангенциальной фильтрации АКТА flux S (Cytiva, США). Определение чистоты и гликанового профиля проводили с использованием хроматографа Vanquish Flex UHPLC Systems (Thermo Scientific, США) и колонок BioSep SEC-s3000 (Phenomenex, США) и Accucore™ 150 Amide HILIC (250×2,1 мм, диаметр частиц 2,6 мкм, размер пор 150 Å) (Thermo Scientific, США). Для определения размера наночастиц использовали Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Для работы с эукариотической культурой клеток использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп СКХ41 (Olympus, Япония), шейкер-инкубатор для культур клеток Multitron (Infors HT, Швейцария), волновой биореактор Biostat CultureBag RM (Sartorius, Германия). Кроме того, в работе использовали следующее оборудование: амплификаторы T100 и CFX96 (Bio-Rad, США), шкаф ламинарный 2-го класса защиты Laminar Flow Cabinet (Esco, Сингапур), система очистки воды Milli-Q Elix 5 (Merck Millipore, США), холодильные установки CarboMa R700 (Полюс, Россия), морозильная (-20 °C) и низкотемпературная (-70 °C) MDF-DU300H-PE (PHCbi, Сингапур) установки, настольный

полуавтоматический автоклав 2540ML (Tuttnauer, Израиль), термостат-инкубатор микробиологический BD 53 (Binder, Германия), осмометр криоскопический K-7400S (Knauer, Германия), pH-метр Seven Multi (Mettler Toledo, США), центрифуги Allegra 25R (Beckman Coulter, США), Centrifuge 5804R и микроцентрифуга Centrifuge 5417C (Eppendorf, Германия), мини-центрифуга-вортекс FVL-2400N (BioSan, Латвия), камеры для горизонтального электрофореза Wide Mini-Sub Cell GT и Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, США), источники питания для электрофореза PowerPack Basic (Bio-Rad, США) и Эльф-4 (ДНК-Технология, Россия), термостат твердотельный Bio TDB-100 (BioSan, Латвия), термошейкер для планшетов PST-60HL-4 (BioSan, Латвия), водяная баня WB-4MS (BioSan, Латвия), электронные аналитические весы EX224 (Ohaus, США), ледогенератор HKN-GB20C (Hurakan, Китай), автоматические пипетки Easypet 3 (Eppendorf, США), дозаторы Ленпипет (Thermo Scientific, США), магнитные мешалки MS-3000 (BioSan, Латвия), мультимодальный ридер Varioscan LUX (Thermo Scientific, США). Для доклинических исследований на животных использовали следующее оборудование: гематологический анализатор Гемалайт 1280 (Dixon, Россия), биохимический анализатор ERBA XL-100 (Erba Mannheim, Германия), анализатор мочи на тест-полосках URiСКАН-strip (Эйлитон, Россия), беспроводная система регистрации и анализа ЭКГ Физиобелт (Нейробиотикс, Россия), установка «Открытое поле» для крыс (OpenScience, Россия), анализатор коагулометрический АПГ4-03-Пх (Эмко, Россия), станция вырезки LDB2000 (LEEC Limited, Великобритания), тканевый процессор Leica TP1020 (Leica Biosystems, США), станция для заливки в парафин HistoCore Arcadia C (Leica Biosystems, США), ротационный микротом Leica RM2265 (Leica Biosystems, США), водяная баня для расплавления срезов Leica HI1210 (Leica Biosystems, США), нагревательный столик Leica HI1220 (Leica Biosystems, США), автомат окрашивания Leica Autostainer XL ST5010 (Leica Biosystems, США).

2.3 Расходные материалы

Слайды для подсчета клеток Counting Slides TC20 (Bio-Rad, США), пробирки 1,5 мл (Eppendorf, Германия), пробирки центрифужные 15 мл и 50 мл (Corning, США), планшеты культуральные 6-луночные, 24-луночные и 96-луночные (Costar, Corning, США), колбы Эрленмейера 125, 500, 1000, 2000 мл (Corning, США), культуральные матрасы (флаконы) 25 см² (Corning, США), пипетки серологические 1, 5, 10, 25 мл Serological Pipets (Corning, США), криоампулы 1,2 мл (Corning, США), шприцевые фильтры 0,22 мкм Millex-GP (Merck, США), система вакуумной фильтрации Vacuum Filter (Corning, США), тест-полоски для анализатора мочи URISCAN 11 strip (Эйлитон, Россия).

2.4 Методы

2.4.1 Основные использованные методы

*Получение высококомпетентных клеток *E.coli* и их трансформация методом теплового шока*

Компетентные клетки *E.coli* DH5 α получали, следуя стандартной методике получения компетентных клеток с помощью CaCl₂, описанной Chang, et al [44]. Эффективность трансформации компетентных клеток рассчитывали путем трансформации плазмидной ДНК pBluescript II SK(+). Значение эффективности трансформации рассчитывали путем посева на культуральные чашки с агаризованной средой многократно разведенных образцов трансформированных клеток и подсчета образовавшихся колоний по формуле: эфф.трансф. = (число колоний / количество ДНК / разведение).

Трансформацию компетентных клеток проводили согласно стандартному методу теплового шока [44].

Вертикальный белковый электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез белковых препаратов проводили с использованием коммерческих полиакриламидных гелей (ПААГ) с градиентом плотности TGX Stain-Free (Bio-Rad, США) в условиях 200 В постоянного напряжения в течение 30

мин. В качестве буферного раствора использовали трис-глициновый буфер (TGB), содержащий 25 мМ трис, 192 мМ глицин, 0,1% SDS, pH=8,3. Перед внесением образцов в лунки геля проводили их предварительную подготовку путем смешивания 3:1 с 4-кратным раствором Laemmli sample buffer (Bio-Rad, США) содержащим (электрофорез в восстанавливающих условиях) или не содержащим (электрофорез в невосстанавливающих условиях) 2-меркаптоэтанол (9:1 раствора к 2-меркаптоэтанолу соответственно). Для электрофореза в восстанавливающих условиях проводили инкубирование подготовленных образцов при 98 °С в течение 5 мин. В качестве маркера молекулярного веса белков использовали смесь Precision Plus Unstained в количестве 6 мкл/лунка. Процесс завершали при визуальном достижении линии фронта красителя нижнего края геля. Результат визуализировали путем проявления геля с помощью Gel Doc EZ (Bio-Rad, США) в течение 2,5 мин и обрабатывали в программе ImageLab (Bio-Rad, США).

Горизонтальный электрофорез ДНК в агарозном геле

Перед проведением электрофореза, проводили подготовку геля путем замешивания 1% раствора агарозы в TAE-буфере (40 мМ трис, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА) и ее растворения путем кипячения, дальнейшего охлаждения, добавления бромистого этидия в конечной концентрации 0,01%. Перед внесением в лунки геля, анализируемые образцы смешивали с буфером для нанесения проб 4x Gel Loading Dye (Евроген, Россия) в количестве 3:1 соответственно. В качестве маркера молекулярного веса использовали 1 kb DNA Ladder (Евроген, Россия), который вносили в лунку в количестве 5 мкл. Электрофорез проводили в TAE-буфере в условиях напряженности электрического поля 5 В/см в течение 25 мин. Результат визуализировали путем проявления геля с помощью Gel Doc EZ (Bio-Rad, США) и обрабатывали в программе ImageLab (Bio-Rad, США).

Аналитический рестрикционный гидролиз ДНК

Рестрикционный гидролиз проводили с использованием специфических эндонуклеаз рестрикции FastDigest (Thermo Scientific, США). Для этого в пробирке типа эппендорф замешивали смесь, которую инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. Количества используемых компонентов в смеси представлены в Таблице 4.

Далее, весь объем смеси подвергали горизонтальному ДНК электрофорезу в агарозном геле. В качестве контроля использовали 1,5 мкг исходной (без обработки эндонуклеазами) плазмидной ДНК.

Таблица 4 – состав рестрикционной смеси для аналитического гидролиза

Компонент смеси	Объем компонента
Вода очищенная	13,6 мкл
Буфер для гидролиза FastDigest Buffer (10x)	2,0 мкл
Плазмидная ДНК (1,0 мг/мл)	2,0 мкл
Эндонуклеаза рестрикции 1	0,2 мкл
Эндонуклеаза рестрикции 2	0,2 мкл

Рестрикционный гидролиз ДНК для стабильной трансфекции

Перед постановкой стабильной трансфекции эукариотических клеток проводили подготовку плазмидной ДНК, проводя рестрикционный гидролиз с использованием специфической эндонуклеазы рестрикции. Для этого в пробирке типа эппендорф замешивали смесь, которую инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. Количества используемых компонентов в смеси представлены в Таблице 5. Далее, 2 мкл из смеси подвергали горизонтальному ДНК электрофорезу в агарозном геле для проверки результата рестрикции. В качестве контроля использовали 1,5 мкг исходной (без обработки эндонуклеазами) плазмидной ДНК. Положительным результатом прохождения гидролиза считали отсутствие бендов любого уровня интенсивности свечения на уровне молекулярной массы контрольной плазмидной ДНК.

Таблица 5 – состав рестрикционной смеси для стабильной трансфекции

Компонент смеси	Объем компонента
Вода очищенная	3,5 мкл
Буфер для гидролиза FastDigest Buffer (10x)	3,0 мкл
Плазмидная ДНК (1,0 мг/мл)	20,0 мкл
Эндонуклеаза рестрикции 1	2,5 мкл

Молекулярное клонирование

Для молекулярного клонирования проводили обработку плазмидных ДНК, одна из которых использовалась в качестве вектора, а другая – несущая целевую последовательность, специфическими нуклеазами рестрикции. После оценки прохождения рестрикции путем аналитического электрофореза плазмидную ДНК, содержащую вектор, подвергали дефосфорилированию щелочной фосфатазой FastAP в соответствии с рекомендациями производителя. После этого проводили электрофорез всего объема ДНК в агарозном геле и выделяли необходимые фрагменты ДНК с помощью набора Cleanup Standart (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя, после чего проводили лигирование данных отрезков Т4 ДНК-лигазой, добавляя к реакционной смеси 1 мкл фермента, и инкубировали при 16 °С в течение ночи.

Получение и очистка плазмидной ДНК

Для получения плазмидных ДНК в препаративных количествах компетентные клетки *E.coli* трансформировали целевой плазмидной ДНК методом теплового шока. Далее, одну из получившихся колоний на чашке Петри переносили в бактериальную колбу с объемом среды 2xYT 100 мл, с добавлением антибиотика ампициллина 50 мкг/мл. Далее колбу растили ночь при 37 °С при постоянных оборотах 210 об/мин. После этого бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 6000×g в течение 8 мин при 4 °С. Клетки лизировали и проводили выделение ДНК с помощью набора HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Scientific, США) согласно инструкции производителя. Растворение выделенной ДНК проводили в стерильной воде.

Переосаждение плазмидной ДНК

Переосаждение плазмидной ДНК проводили перед постановкой стабильной трансфекции эукариотических клеток. Для этого в рестрикционную смесь, содержащую ДНК, добавляли 0,1 от объема раствора 3М ацетата натрия и 2,8 от объема 96% этанол. Смесь перемешивали и замораживали при -80 °С в течение 1 часа. Далее проводили центрифугирование смеси при 12000×g в течение 20 мин при 4 °С. Надосадочную жидкость отбирали, добавляли 70% раствор этанола, после чего сразу отбирали и оставляли в термостате при 37 °С для удаления остатков этанола (10-20 мин). После этого ДНК растворяли в объеме 50 мкл стерильной воды, перемешивали и инкубировали при 37 °С 20 мин для полного растворения ДНК. Смесь перемешивали, концентрацию ДНК определяли при помощи спектрофотометра Nanodrop.

Иммуноблоттинг

Для визуализации специфического связывания с белками определенной молекулярной массы первоначально проводили вертикальный белковый электрофорез в ПААГ. Далее проводили полусухой перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану Protran Premium 0.45 µm NC (Amersham, Cytiva, Швеция) с использованием системы Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, США) при значениях тока и напряжения 2,5А и 25В, 3 мин. После этого мембрану инкубировали в 5% растворе обезжиренного молока в PBST при 37 °С в течение 1 часа. Далее добавляли первичные антитела, специфичные к антигену и повторяли инкубирование. Мембрану отмывали в PBST 3 раза по 10 мин при 37 °С и постоянном качании при 60 об/мин. Затем вносили вторичные антитела (конъюгат), растворенный в 5% обезжиренном молоке и инкубировали аналогично первичным антителам. После этого мембрану отмывали 5 раз PBST аналогичным образом и визуализировали с использованием субстрата ECL Clarity (Bio-Rad, США) и проявки с использованием анализатора Amersham Imager 600 (GE, США).

Подсчет и определение выживаемости эукариотических клеток

Для оценки количества клеток и определения выживаемости проводили смешивание пробы, отобранной из колбы с клетками, с красителем 0,4%

трипанового синего, проводя смешивание в соотношении 1:1, по 10 мкл каждого. Далее, 10 мкл окрашенного образца с клетками переносили в слайд для подсчета клеток и проводили подсчет с помощью автоматического счетчика TC20 (Bio-Rad, США). Дополнительно процент выживаемости контролировали путем визуального осмотра слайда на соотношение окрашенных и неокрашенных (мертвых и живых) клеток.

Криоконсервирование и разморозка эукариотических клеток

Криоконсервирование эукариотических клеток осуществляли путем отбора и осаждения клеточной культуры, находящейся в активной фазе пролиферации, из расчета $45 \cdot 10^6$ клеток на 1 криоампулу; осаждение проводили при $200 \times g$ в течение 5 мин. Осажденные клетки ресуспендировали в свежей питательной среде, оставляя 10% кондиционированной среды. ДМСО добавляли 10% от конечного объема среды. Итоговый объем консервируемой смеси составлял 1,2 мл на 1 криоампулу. Замораживание осуществляли путем постепенного снижения температуры до $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Спустя 2 суток криоампулу перемещали в криохранилище с жидким азотом.

Разморозку эукариотических клеток осуществляли путем размораживания криопробирки из криохранилища в водяной бане при $37 \text{ }^\circ\text{C}$ до момента начала оттаивания. Далее содержимое пробирки перемещали в колбу со свежей питательной средой в объеме 30 мл.

Измерение концентрации антител методом биослойной интерферометрии

Проведение анализа концентрации антител в образцах культуральной жидкости проводили методом биослойной интерферометрии с использованием прибора Octet RED96 (Sartorius, Германия) и сенсоров с иммобилизованным белком A Protein A (Sartorius, Германия). Измерение проводили в соответствии с протоколом производителя. В качестве стандартных образцов использовали очищенные измеряемые антитела в концентрациях 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 0 мкг/мл.

2.4.2 Получение VoNT/A

VoNT/A получали в виде комплекса VoNT/A с НА и NTNН (800 кДа). Токсин получали и очищали следующим образом: штамм *C.botulinum* А98 культивировали в анаэробных условиях в среде TGY (триптон-глюкозный дрожжевой экстракт) в течение пяти дней при 37 °С. Бактериальные клетки отделяли центрифугированием при 5000×g в течение 30 мин при 10 °С. Надосадочную жидкость фильтровали через шприцевой фильтр 0,22 мкм. Белки культурального фильтрата концентрировали кислотным осаждением при помощи добавления 1/10 от объема 100% трихлоруксусной кислоты (с конечным рН 3,8) в течение 45 мин. Осадок осаждали центрифугированием при 12000×g в течение 30 мин при 10 °С, и растворяли в 47 мМ цитратно-фосфатном буфере с рН 5,6. Далее проводили гель-фильтрацию с использованием Sephacryl S-300 (Cytiva, США) и анионообменную хроматографию с использованием DEAE Sepharose (Cytiva, США), которую проводили на системе АКТА start (Cytiva, США). Токсин перед инъекцией фильтровали через шприцевой фильтр 0,22 мкм.

Концентрацию VoNT/A определяли спектрофотометрически (длина волны 280 нм). Наличие или отсутствие белковых примесей оценивали вертикального белкового электрофореза в полиакриламидном геле, в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. LD₅₀ определяли при помощи введения нескольких разведений токсина мышам BALB/c (18-20 г). Удельная активность используемого токсина варьировалась от 0,5 до 1,5 нг/кг среди различных партий VoNT/A, поэтому оценку специфической токсической активности проводили перед каждым экспериментом и для каждой партии животных и токсина.

2.4.3 Получение эукариотического клона-продуцента, стабильно продуцирующего VHN-Fc

Трансфекция

Для получения продуцента VHN-Fc использовали клетки СНО (клетки яичника китайского хомяка). Для этого предварительно полученную в

бактериальной культуре целевую плазмидную ДНК в количестве 20 мкг подвергали рестриktionному гидролизу с использованием эндонуклеазы рестрикции Alw44I. Результат рестриktionного гидролиза плазмидной ДНК оценивали с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле. Далее плазмидную ДНК переосаждали.

Трансфекцию проводили на клетках СНО, высеянных в два культуральных 6-луночных планшета в концентрации $0,5 \cdot 10^6$ клеток/мл в объеме 1 мл на бессывороточной среде TransFX-C, предварительно двухкратно отмыв клетки от кондиционированной среды путем ресуспендирования в свежей среде и последующего осаждения центрифугированием при $200 \times g$ в течение 5 мин. Трансфекцию проводили, используя 5% среды Opti-MEM I от объема питательной среды; в нее добавляли целевую или контрольную плазмидные ДНК, после чего использовали реагент для трансфекции PEI в соотношении 1:3 соответственно. Полученные смеси инкубировали 7, 20 и 17 мин соответственно, после чего их добавляли в питательную среду. После проведения трансфекции планшеты культивировали в термостате при $37 \text{ }^\circ\text{C}$ и 5% CO_2 . Спустя 24 часа эффективность трансфекции косвенно оценивали с помощью флуоресцентного микроскопирования по количеству клеток, экспрессирующих зеленый флуоресцирующий белок EGFP в лунках с клетками, трансфецированными контрольной плазмидной ДНК.

Селекция трансфецированных клеток

Через 48 часов после трансфекции проводили селекцию трансфецированных клеток путем пересева клеток в лунках при достижении высокой плотности ($>4 \cdot 10^6$ клеток/мл) путем отбора 1/2 объема с клетками и добавления такого же объема среды SFM4СНО, содержащей антибиотик пуромицин в концентрации 5 мкг/мл. В качестве контрольных выступали лунки с клетками не трансфецированными плазмидным вектором, а также лунки с не трансфецированными клетками в среде без добавления антибиотика. Селекцию проводили в течение 7 суток, во время которых происходила гибель не трансфецированных плазмидной ДНК клеток и размножение клеток, получивших вставку с геном VNN-Fc и устойчивости к

пурамицину. Критерием успешного прохождения селекции являлось достижение выживаемости менее 40% в лунках с нетрансфицированными клетками со средой, содержащей антибиотик.

Селекция и отбор клон-продуцента

После прохождения селекции, пул клеток, трансфицированных плазмидной ДНК pVACP-B11-Fc, рассевали в 5 культуральных 96-луночных планшетов с концентрацией 0,5 клеток в лунку и объемом SFM4CHO 150 мкл/лунка, содержащей 3 мкг/мл пурамицина. 20% от общего объема среды используемой среды для посева на планшеты составляла кондиционированная среда SFM4CHO, отобранная от нетрансфицированных клеток CHO, которую подготавливали путем центрифугирования среды при $1000\times g$ в течение 5 мин. Культивирование проводили при 37 °C и 5% CO₂ до момента появления видимых колоний пролиферирующих клеток, которые занимают не менее 1/4 от площади лунки (около 12 суток). Для дальнейшей работы отбирали только те лунки, в которых пролиферация осуществлялась из одной клетки, т.е. наблюдалась 1 точка роста. Каждые 6 дней проводили восполнение объема испарившейся в лунках культуральной среды путем внесения 80 мкл свежей SFM4CHO, содержащей пурамицин 3 мкг/мл.

Уровень экспрессии VHH-Fc в лунках, содержащих колонии пролиферирующих клеток, оценивали при помощи ИФА на иммунологических планшетах из набора IgG общий-ИФА-БЕСТ (АО Вектор-Бест, Россия), которые предсорбированы антигеном, специфичным к Fc-фрагменту человеческого IgG. Культуральную жидкость из анализируемых лунок вносили в количестве 100 мкл/лунка. В качестве конъюгата использовали Goat Anti-Human IgG (Fc specific) [HRP] (1:5000). После интерпретации результатов и сравнения уровня сигнала с количеством клеток в лунках, 24 лучших клон пересевали на 24-луночные культуральные планшеты с объемом среды SFM4CHO 250 мкл/лунка. После достижения плотности 2×10^6 клеток/мл проводили повторную оценку продуктивности клонов. После этого отбирали 5 лучших клонов и проводили их пересев в культуральный матрас (флакон) площадью 25 см².

При достижении концентрации $3 \cdot 10^6$ клеток/мл проводили оценку уровня экспрессии клонов с использованием метода биослойной интерферометрии на сенсорах с иммобилизованным белком А. Наличие белковых примесей в культуральной жидкости, содержащей антитела, оценивали путем вертикального белкового электрофореза культуральной жидкости в ПААГ в восстанавливающих условиях. Продукцию однодоменного антитела подтверждали путем иммуноблоттинга культуральной жидкости в восстанавливающих условиях. В качестве первичных специфических антител к Fc-рецептору B11-Fc использовали Goat Anti-Human IgG (Fc specific) [HRP] (1:2500). Клон-производитель, обладающий максимальным уровнем экспрессии VHH-Fc, пересевали в колбу объемом 125 мл, в объем бессывороточной среды SFM4CHO 15 мл. Далее осуществляли наработку биомассы клеток путем многократного пересева клеток в увеличенный объем среды при достижении концентрации $3 \cdot 10^6$ клеток/мл и создание системы банков клеток методом криоконсервирования.

Исследование чистоты полученных банков штамма-производителя

Стерильность полученных банков клеток оценивали в соответствии с ГФ XIII ОФС 42-0066-15.

Наличие микоплазм оценивали с помощью ПЦР. ДНК из клеточной суспензии выделяли при помощи коммерческого набора Wizard Genomic DNA Purification Kit согласно инструкции производителя.

Оценку вирусной контаминации проводили согласно требованиям ГФ XIII ОФС ОФС.1.7.2.0006.15.

Исследование генетической стабильности клона-производителя

Изучение генетической стабильности клона-производителя проводили путем длительного культивирования клеток. Для этого исследуемый клон-производитель размораживали из исследовательского банка клеток в колбу объемом 125 мл в объем питательной среды SFM4CHO 30 мл. Спустя 48 часов клетки пересевали до плотности $0,2 \cdot 10^6$ клеток/мл в объеме 30 мл. Пересев клеток проводили каждый раз при достижении плотности $3 \cdot 10^6$ клеток/мл. Перед пересевом каждого 5 пассажа (т.е. на 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 пассажах) отбирали 1 мл

культуральной жидкости в пробирку типа эппендорф, клетки осаждали центрифугированием при $200\times g$ в течение 5 мин и замораживали в условиях $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Данные образцы использовали для оценки уровня продуцированных VHH-Fc в культуральной жидкости.

Количество антител в исследуемых образцах определяли методом их измерения с помощью метода биослойной интерферометрии на сенсорах с иммобилизованным белком А. По количеству антител в исследуемых образцах культуральной жидкости разных пассажей делали вывод о стабильности клонов-продуцентов.

2.4.4 Оптимизация процесса культивирования

С целью увеличения выхода антител проводили оптимизацию процесса культивирования. Для этого предварительно проводили постепенную адаптацию клеток на различные питательные среды путем замены 25% питательной среды на адаптируемую каждые 3 пассажа. После этого, клетки высевали в одинаковой плотности в колбы Эрленмейера с рабочим объемом 50 мл и осуществляли культивирование, проводя ежедневное добавление подпиток в соответствии с инструкцией производителя. Культивирование осуществляли при постоянных условиях $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 75% влажности, 5% CO_2 . Ежедневно проводили подсчет количества клеток, оценку выживаемости, микроскопическое изучение морфологии клеток. Кроме того, ежедневно проводили контроль уровня глюкозы и в случае снижения концентрации $<2\text{ г/л}$ добавляли 40% раствор глюкозы в количестве 4 г/л. Также ежедневно контролировали уровень pH. При его снижении $<6,9$ проводили добавление 7,5% раствора NaHCO_3 до уровня 7,2-7,4. Продукцию осуществляли до снижения выживаемости клеток менее 85%. Анализ концентрации антитела в культуральной жидкости проводили с использованием Octet RED96.

2.4.5 Продукция VHH-Fc стабильным клоном-продуцентом в лабораторном масштабе

Продукцию VHH-Fc в лабораторном масштабе проводили в суспензионных условиях культивирования клон-продуцента. Для этого криоампулу с клоном-продуцентом размораживали и помещали в культуральную колбу Эрленмейера объемом 500 мл, в объем среды 30 мл. Культивирование осуществляли при постоянных условиях 37 °С, 75% влажности, 5% CO₂; число об/мин варьировали в зависимости от объема и выставляли такое значение, при котором происходило касание уровнем жидкости дна колбы. Ежедневно проводили подсчет количества клеток, оценку выживаемости, микроскопическое изучение морфологии клеток. При достижении клетками концентрации 3*10⁶ клеток/мл проводили добавление культуральной среды до концентрации 0,5*10⁶ клеток/мл; в случае превышения максимального рабочего объема колбы проводили пересев всего объема среды в колбу большего объема. Таким образом, накапливали биомассу клеток до необходимого количества. Максимальный конечный объем питательной среды с клетками составлял не более 70% от рабочего объема.

В случае продукции антитела в биореакторе волнового типа проводили накопление биомассы до суммарного количества не менее 1*10⁹ клеток, после чего культуральную жидкость с клетками перемещали в биореакторный мешок рабочим объемом 10 л, доведя объем культуральной среды до 1 л. Дальнейшее накопление биомассы проводили до достижения 70% от рабочего объема.

При достижении желаемого объема, клетки культивировали до достижения концентрации 3-4*10⁶ клеток/мл, после чего проводили ежедневное добавление подпиток CellBoost 7a и CellBoost 7b (Cytiva, США) в соответствии с подобранной оптимальной схемой культивирования. Кроме того, ежедневно проводили контроль уровня глюкозы и в случае снижения концентрации <2 г/л добавляли 40% раствор глюкозы в количестве 4 г/л. Также ежедневно контролировали уровень pH. При его снижении <6,9 проводили добавление 7,5% раствора NaHCO₃ до уровня 7,2-7,4.

Продукцию осуществляли до снижения выживаемости клеток менее 85%. Культуральную жидкость осветляли центрифугированием при $8000\times g$, 4 °C, 10 мин. Осветленную жидкость фильтровали с помощью системы вакуумной фильтрации 0,22 PES. После этого проводили хроматографическую очистку культуральной жидкости.

2.4.6 Хроматографическая очистка VHH-Fc

Аффинная очистка

Очистку VHH-Fc проводили с использованием сорбента MabSelect SuRe с иммобилизованным белком А (Cytiva, США), обладающего аффинностью к Fc-фрагменту антитела. Процедуру подготовки и очистки осуществляли согласно протоколу производителя. В качестве связывающего буфера использовали раствор, содержащий 150 мМ NaCl, 15 мМ Na_2HPO_4 , 5 мМ NaH_2PO_4 , 0,1% твин-80, pH=7,2. В качестве буферов для элюирования использовали раствор, содержащий 20 мМ цитрата натрия (pH=2,8) и раствор, содержащий 200 мМ глицина (pH=2,8). Для снижения уровня pH буферных растворов использовали 5 М HCl. После элюирования раствор инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре для вирусной инактивации потенциальных контаминантов в буферах, используемых при очистке, после чего уровень pH повышали до 7,2 путем добавления раствора 1 М Tris-HCl (pH=8,0).

Анионообменная очистка

После аффинной очистки, проводили анионообменную очистку от примесей с использованием мембранного адсорбера Sartobind Q Nano 3 мл (Sartorius, Германия). Подготовка и очистку проводили согласно протоколу производителя. В качестве связывающего буфера использовали раствор, содержащий 150 мМ NaCl, 20 мМ Tris, pH=6,8.

Очистка с использованием керамического гидроксипатита

Завершающий этап очистки проводили с использованием керамического гидроксипатита СНТ Type I (Bio-Rad, США). Подготовка и очистку проводили согласно протоколу производителя. Для предварительного уравнивания

сорбента использовали раствор, содержащий 75 мМ Na_2HPO_4 , 25 мМ NaH_2PO_4 , 6 ppm CaCl_2 , pH=7,5. Далее колонку уравнивали раствором, содержащим 150 мМ NaCl , 20 мМ Tris, pH=6,8. После проводили нанесение образца (pH=6,8). Далее проводили промывание раствором, содержащим 150 мМ NaCl , 20 мМ Tris, pH=6,8. Элюирование целевых фракций осуществляли раствором, содержащим 150 мМ NaCl , 15 мМ Na_2HPO_4 , 5 мМ NaH_2PO_4 , 0,1% твин-80, pH=7,2. Элюирование агрегатов проводили с использованием раствора для предварительного уравнивания. Полученные целевые фракции антитела стерилизовали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

2.4.7 Противовирусная фильтрация и формулирование препарата

Перед противовирусной фильтрацией препарат антител фильтровали через предфильтр Sartopore 2 0,2-0,1 мкм. Далее проводили противовирусную фильтрацию препарата через фильтр Virosart CPV 200 см². Формулирование препарата, доведение pH и осмолярности проводили на установке тангенциальной фильтрации АКТА flux S и картриджей с отсечкой 30 кДа 480 см². Финальную стерилизующую фильтрацию проводили с использованием фильтра Corning 1L Filter System.

Подбор формулирующего буферного раствора проводили методом ускоренного старения препарата в соответствии с ГФ XII ОФС 42-0075-07.

2.4.8 Определение чистоты антитела методом гель-фильтрации

Анализ чистоты очищенного антитела проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в соответствии со стандартной методикой [145] с использованием колонки BioSep SEC-s3000. Перед анализом колонку уравнивали подвижной фазой при скорости потока 0,5 мл/мин около 0,5–1 ч. Подвижная фаза состояла из 12,64 г динатрия гидрофосфата дигидрата, 4,52 г натрия дигидрофосфата дигидрата, 8,77 г натрия хлорида и 1000 мл воды, pH 7,0.

Для определения чистоты испытуемого образца вычисляли относительное содержание пика мономера (P , %) по формуле:

$$P = 100 \times A \div A_{sum}, \quad (1)$$

где:

A – среднее значение площади пика мономера, рассчитанное по трем хроматограммам испытуемого раствора;

A_{sum} – среднее значение суммарной площади всех идентифицируемых пиков белковой природы, рассчитанное по трем хроматограммам испытуемого раствора.

2.4.9 Определение чистоты антитела методом измерения размера наночастиц в растворе

Определение чистоты методом измерения размера наночастиц в растворе проводили с использованием прибора Zetasizer Nano ZS в соответствии с инструкцией производителя. Показания прибора обнуляли по буферному раствору, свободному от посторонних примесей. Образцы очищенных антител помещали в одноразовую кювету в объеме 1 мл. Измерение размеров наночастиц в растворе проводили в автоматическом режиме прибора.

2.4.10 Изучение наличия остаточной ДНК штамма-продуцента

Исследование наличия остаточной ДНК штамма-продуцента проводили с использованием ПЦР в реальном времени с использованием набора resDNASEQ Quantitative CHO DNA Kit в соответствии с инструкцией производителя. Выделение ДНК проводили с использованием набора PrepSEQ Residual DNA Sample Preparation Kit в соответствии с инструкцией. Все процедуры проводили в боксе для выделения ДНК с соблюдением правил работы в ПЦР-лаборатории.

2.4.11 Изучение наличия остаточных белков штамма-продуцента и белка А

Исследование остаточных белков штамма-продуцента и белка А проводили методом ИФА с использованием наборов CHO HCP ELISA Kit, 3G (F550-1) и Protein A-H ELISA Kit (Human IgG) (F050H) соответственно. Испытуемый образец разводили до концентрации 150 мкг/мл в несколько шагов водой очищенной. Далее все манипуляции осуществляли согласно протоколу производителя. Результаты измерения оптической плотности использовали для построения калибровочной кривой, по данным которой определяли концентрацию остаточных белков клеток CHO в испытуемых образцах.

2.4.12 Исследование пирогенности препарата антител В11-Fc

Для изучения наличия пирогенных веществ в препарате антител В11-Fc проводили испытание ферментативным методом с использованием лимулус-амебоцитного лизата (ЛАЛ-тест) с использованием ЛАЛ-реактива Endosafe КТА в соответствии с инструкцией производителя.

2.4.13 Определение гликанового профиля антитела методом гель-фильтрации

Анализ содержания основных форм гликанов в препарате антитела проводили методом ВЭЖХ, описанным ранее, с использованием колонки Accucore 150 Amide HILIC и стандартов гликанов G0-N, G0F-N, G0, Man5, G1, G1F, G2F, G0F (Agilent, США). Испытуемый раствор антитела разводили до концентрации 10 мг/мл, после чего обессоливали. Раствор в объеме 80 мкл концентрировали с использованием центрифужного концентратора с пределом отсечения 10 кДа, разбавляя водой до 500 мкл. Образец центрифугировали при 9000×g до достижения объема 50 мкл, после чего процедуру повторяли трижды. После этого проводили ферментативное отщепление гликанов путем смешивания 16 мкл полученного образца, 2 мкл концентрата буферного раствора 10X и 2 мкл N-гликозидазы, затем инкубировали 17-18 ч.

2.4.14 Измерение аффинности взаимодействия Fc-фрагмента VHH-Fc с разными классами Fc рецепторов

Измерение аффинности взаимодействия Fc-фрагмента VHH-Fc с разными классами Fc рецепторов проводили методом биослойной интерферометрии с использованием прибора Octet RED96 (Sartorius, Германия) и сенсоров Ni-NTA (Sartorius, Германия). Измерение проводили в соответствии с протоколом производителя в режиме кинетического измерения. Параметр «Baseline» измеряли в течение 30 секунд в кинетическом буфере (150 мМ NaCl, 20 мМ фосфат натрия, азид натрия, pH 7,2). Белки FcRn, CD16a, CD16b, CD32a, CD32b, γ RI загружали на сенсоры в концентрациях 30 мкг/мл в течение 60 с. VHH-Fc вносили в лунки в молярных концентрациях 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,813 и 0 нМ в кинетическом буфере на 300 с. Диссоциацию осуществляли в кинетическом буфере в течение 300 с. Анализ полученных данных выполняли с использованием программного обеспечения Octet Data Analysis 10.0.

2.4.15 Изучение возможности Fc-зависимой активации комплемента антителом VHH-Fc

Способность к Fc-зависимой активации комплемента антителом VHH-Fc оценивали при помощи ИФА на сорбированных антигеном C1q иммунологических планшетах. Сорбцию проводили, добавляя в каждую лунку раствор антигена C1q в концентрации 200 нг/лунка в карбонатно-бикарбонатном буфере (pH=9.5); планшет инкубировали в течение ночи при 4 °С. Далее планшет отмывали раствором PBST и вносили 5% раствор обезжиренного молока в PBST. Спустя 1 ч инкубирования при 37 °С вносили анализируемый VHH-Fc в различных концентрациях в 5% растворе обезжиренного молока в PBST. После инкубации планшет отмывали и вносили раствор вторичных антител NA933 с пероксидазой хрена (1:5000) в 5% растворе обезжиренного молока в PBST. После отмывки от вторичных антител вносили раствор субстрата TMB, выдерживали 20 мин и затем

добавляли раствор 1М соляной кислоты. Измерения проводили на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

2.4.16 Оценка токсичности ВоNT/A на острой внутрибрюшинной и внутрижелудочной моделях интоксикаций

Для изучения токсичности различных доз ВоNT/A по скорости наступления симптомов и гибели животных при интоксикации мышей внутрибрюшинно и внутрижелудочно, использовали мышей линии BALB/c. Для изучения внутрибрюшинной интоксикации использовали дозы 5 и 10 LD₅₀, и группы из 5 мышей. Для изучения внутрижелудочной интоксикации – 3000, 6000, 12000, 18000 LD₅₀, и группы из 10 мышей. Тяжесть токсических признаков оценивали по следующим признакам: западение передней брюшной стенки, агональное дыхание, вялость, слабость, паралич тела.

2.4.17 Подбор протективной дозы VHH-Fc против 10 LD₅₀ ВоNT/A

Для подбора протективной дозы полученного VHH-Fc против 10 LD₅₀ ВоNT/A группам из 5 мышей BALB/c проводили внутрибрюшинное введение 10 LD₅₀ ВоNT/A, после чего внутривенно вводили VHH-Fc в дозах 1,2, 0,6, 0,3, 0,06 и 0,03 мг/кг. В качестве отрицательного контроля использовали мышей, которым вводили буферный раствор вместо антител. Протективные свойства оценивали по выживаемости мышей и симптомам ботулизма в период 5 суток после интоксикации.

2.4.18 Оценка защитного потенциала протективной дозы VHH-Fc против высоких доз ВоNT/A

Для оценки возможности защиты полученным VHH-Fc от более высоких доз ВоNT/A группам из 5 мышей BALB/c проводили внутрибрюшинное введение ВоNT/A в дозах 5, 10, 20, 50 и 100 LD₅₀, после чего сразу внутривенно вводили VHH-Fc в протективной дозе. В качестве отрицательного контроля использовали

мышей, которым вводили буферный раствор вместо антител. Протективные свойства оценивали по выживаемости мышей и симптомам ботулизма в период 5 суток после интоксикации.

2.4.19 Фармакокинетика и изучение защиты от внутрибрюшинной интоксикации BoNT/A в различных режимах применения VHH-Fc *in vivo*

Для расчета фармакокинетических параметров проводили внутривенное введение препарата VHH-Fc группе из 3 мышей, после чего отбирали кровь из хвостовой вены в следующие временные точки: 0, 1, 4, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 336, 504 и 672 часа. Для получения сыворотки кровь центрифугировали при 3500 об/мин, 15 мин. Полученный материал хранили при -80°C для дальнейшего анализа. Концентрацию VHH-Fc оценивали при помощи ИФА на иммунологических планшетах из набора IgG общий-ИФА-БЕСТ. Сыворотку вносили в количестве 100 мкл/лунка. В качестве калибровочной кривой использовали очищенное антитело VHH-Fc в различных концентрациях. В качестве конъюгата использовали Goat Anti-Human IgG (Fc specific) [HRP] (1:5000).

Для оценки защиты в режиме длительной профилактики группам из 5 мышей проводили внутривенное введение VHH-Fc в протективной концентрации 0,6 мг/кг. Затем, спустя 7, 14, 21 и 28 суток вводили 5 LD₅₀ BoNT/A внутрибрюшинно. В качестве отрицательного контроля использовали мышей, которым вводили буферный раствор вместо антител.

Для оценки защиты в режимах экстренной профилактики и терапии группам из 8 мышей проводили внутривенное введение VHH-Fc в протективной концентрации 0,6 мг/кг спустя 0, 2, 4 и 6 часов после внутрибрюшинной интоксикации 5 LD₅₀ BoNT/A. В качестве отрицательного контроля использовали мышей, которым вводили буферный раствор вместо антител. Протективные свойства оценивали по выживаемости мышей и симптомам ботулизма в период 5 суток после интоксикации.

2.4.20 Изучение возможности терапии VHH-Fc при внутрижелудочной интоксикации мышей BoNT/A *in vivo*

Для оценки возможности применения VHH-Fc в терапевтическом режиме на модели внутрижелудочной интоксикации мышей, группам из 10 животных проводили внутривенное введение VHH-Fc в протективной концентрации 0,6 мг/кг спустя 12, 14, 16, 18, 20 часов после внутрижелудочной интоксикации 12000 LD₅₀ BoNT/A. В качестве отрицательного контроля использовали мышей, которым вводили буферный раствор вместо антител. Протективные свойства оценивали по выживаемости мышей и симптомам ботулизма в период 3 суток после интоксикации.

В качестве контроля сравнения аналогичным образом проводили оценку протективных свойств противоботулинической типа А лошадиной сыворотки в рабочей дозе.

2.4.21 Доклиническое изучение фармакокинетики VHH-Fc

Для оценки фармакокинетики препарата VHH-Fc, самцов кроликов породы Шиншилла разбивали на 3 группы, по 3 особи в каждой. Исследуемый препарат вводили в концентрации 3 мг/мл в буферном растворе NaCl 0,9% однократно, внутривенно, в дозах 6, 30 и 60 мг/животное.

Кровь для анализа у кроликов забирали из ушной вены в следующие временные точки: 0 ч (до введения), 30 мин, 1 час, 2 часа, 4 часа, 8, 12, 24, 48, 72, 120 и 168 часов. На каждую временную точку было использовано 3 кролика. Для получения сыворотки кровь центрифугировали при 3500 об/мин, 15 мин. Полученный материал хранили -80°C для дальнейшего анализа.

Количественное определение исследуемого препарата в сыворотке проводили с помощью ИФА. Для этого поверхность лунок 96-луночного иммунологического планшета сенсibilizировали поликлональными антителами к исследуемому VHH-Fc (получена путем многократной иммунизации кролика антителом VHH-Fc и хроматографической очистки сыворотки с использованием

сорбента MabSelect SuRe с иммобилизованным белком А) в концентрации 5 мкг/мл в карбонатно-бикарбонатном буфере (рН=9.5). После инкубации планшета при 4 °С в течение ночи планшет отмывали раствором PBST. В качестве первичных антител вносили исследуемую сыворотку крови кролика по 100 мкл/лунка, разведенную PBST в 10 и в 100 раз. Параллельно в лунки вносили 100 мкл 5% раствора обезжиренного молока в PBST, содержащего различные концентрации В11-Fc, в диапазоне 10000, 2000, 400, 80, 16, 3.2, 0.64 и 0 нг/мл. После инкубации планшета при 37 °С в течение 1 ч планшет отмывали раствором PBST. В качестве вторичных антител использовали поликлональные антитела кролика к исследуемому VHH-Fc, меченные биотином, в рабочем разведении 1 мкг/мл в 5% растворе обезжиренного молока в PBST. Далее в лунки вносили конъюгат стрептавидина с полипероксидазой хрена в разведении 1:20000 в 5% растворе обезжиренного молока в PBST и инкубировали 30 мин при 37 °С. После отмывки от вторичных антител вносили раствор субстрата ТМВ, выдерживали 20 мин и затем добавляли раствор 1М соляной кислоты. Измерения проводили на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Используя значения оптической плотности и соответствующие им концентрации калибровочных образцов строили калибровочную кривую зависимости оптической плотности раствора от концентрации исследуемого VHH-Fc. Зависимость концентрации от оптической плотности описывали уравнением полиномиальной функции с помощью программного обеспечения Microsoft Excel, вида:

$$Y(OD_{450 \text{ нм}}) = A \times X^{n+3} + B \times X^{n+2} + C \times X^n + D, \quad (2)$$

где:

X – концентрация В11-Fc в лунке, нг/мл; OD450 – оптическая плотность при 450 нм; A, B, C, D – параметры полиномиального уравнения, рассчитываемые Microsoft Excel.

Подставляя в полученное уравнение значения оптической плотности исследуемых разведенных образцов сыворотки, рассчитывали соответствующую

этим значениям концентрацию. Концентрацию В11-Fc в сыворотке крови рассчитывали по формуле:

$$C = (X \times dF) \div 1000, \quad (3)$$

где:

C – концентрация в сыворотке крови, нг/мл;

X – концентрация, рассчитанная по уравнению полиномиальной функции, по значениям оптической плотности;

dF – фактор разведения сыворотки перед внесением в лунки;

1000 – коэффициент для перевода значений концентрации из нг/мл в мкг/мл.

2.4.22 Доклиническое исследование острой токсичности и местного раздражающего действия препарата VHH-Fc

Изучение острой токсичности препарата проводили на аутбредных мышах и крысах при внутривенном введении. Мыши и крысы являются стандартными объектами токсикологических исследований.

Острую токсичность оценивали на мышах (самцах и самках) и крысах (самцах и самках). Методом случайной выборки были сформированы опытные группы самцов и самок мышей и крыс (по 5 голов в каждой группе) (Таблица 6). В качестве критерия принимали массу тела. Кроме того, были сформированы аналогичные по численности группы контрольных животных каждого вида и пола, которым тем же путем вводили 0,9% раствор натрия хлорида. В эксперименте препарат VHH-Fc вводили дважды, с перерывом между введением 4 часа, в максимально возможном объеме при внутривенном введении: 5 мг мышам, 20 мг крысам, суммарно 10 мг и 40 мг соответственно. Препараты вводили однократно внутривенно в боковую вену хвоста. Во время исследования ежедневно утром и во второй половине дня вели наблюдение за каждым животным. В день введения препарата наблюдение проводили каждый час. Массу тела определяли взвешиванием до введения препарата, на 3, 8 и 15 сутки эксперимента. На 15 сутки эксперимента всех животных подвергали эвтаназии методом ингаляции двуокиси углерода (CO₂) с дальнейшим макроскопическим и морфометрическим

исследованием органов. После регистрации смерти мышей и крыс подвергали полной некропсии, которая включала осмотр внешней поверхности тела, всех проходов, черепной, грудной, брюшной полостей с органами и тканями.

Таблица 6 – Дизайн исследования острой токсичности на мышах и крысах

Номер группы	Пол животных	Количество животных	Препарат	Доза препарата, мг/животное	День эвтаназии
1	♂	5	0,9% р-р NaCl	10 (мышь)	15 сутки
2	♀	5		40 (крыса)	
3	♂	5	VНН-Fc	10 (мышь)	
4	♀	5		40 (крыса)	

Для оценки местнораздражающего действия визуально регистрировали отклонения во внешнем виде места введения препарата во время введения, на протяжении исследования и при проведении некропсии.

2.4.23 Доклиническое исследование токсичности и местной токсичности при многократном введении препарата VНН-Fc крысам

Исследование проводили на половозрелых крысах Спрег-Доули разного пола, массой 180-200 г, возрастом 7-8 недель (Таблица 7). Для исследования использовали следующие дозы: 7,5 мг/кг, 15 мг/кг и 30 мг/кг. Исследуемый лекарственный препарат вводили внутривенно, 1 раз в неделю, в течение 28 суток, в объеме 0,5 мл/200 г, 1,0 мл/200 г и 2,0 мл/200 г, соответственно. Плацебо вводили в объеме 2,0 мл/200 г. Животных взвешивали на момент начала и окончания карантина, на момент формирования групп, а также на 7, 14, 21, 28, 35, 42 сутки исследования.

Таблица 7 – Дизайн исследования токсичности на крысах при многократном введении препарата

Путь введения	Количество животных	Доза	Объем введения	Манипуляции
в/в	10♂ + 10♀	7,5 мг/кг	0,5 мл/200 г	В/в введение 1 раз/неделю, в течение 28 суток, взвешивание животных до начала введения, на 7, 14, 21, 28, 35, 45 сутки исследования, регистрация клинической картины ежедневно. На 29, 44 сутки исследования анализ мочи, оценка ССС, поведенческие тесты. Эвтаназия – на 30 (5♀ и 5♀) и 45 (5♀ и 5♀) сутки исследования. На 30, 45 сутки: некропсия, забор крови, оценка местнораздражающего действия.
	10♂ + 10♀	15 мг/кг	1,0 мл/200 г	
	10♂ + 10♀	30 мг/кг	2,0 мл/200 г	
	10♂ + 10♀	-	2,0 мл/200 г	

Поведенческие реакции

На 28 и 42 сутки от начала эксперимента для крыс проводили поведенческий тест «Открытое поле» исследуемых групп животных по сравнению с контрольной группой. Функциональное состояние центральной нервной системы (ЦНС) оценивали по уровню ориентировочной двигательной активности крыс в опытах с одновременной регистрацией в течение 3 мин числа пересеченных животным квадратов («открытое поле»), числа вставаний на задние лапы (вертикальная компонента) и числа заглядываний в отверстия (норковый рефлекс), а также по частоте мочеиспусканий и количеству болюсов. Измерение частоты сердечных сокращений и регистрацию ЭКГ проводили с помощью Системы Физиобелт

(Нейроботикс, Россия) на 28 и 14 сутки эксперимента. ЭКГ снимали у животных, которые в дальнейшем были подвергнуты эвтаназии с последующей некропсией.

Отбор проб

Забор мочи проводили на 14 и 28 сутки от начала эксперимента. Кровь из яремной вены забирали в пробирки с 3,8% раствором натрия цитрата на 29 и 43 сутки от начала эксперимента. Для этого в пробирки центрифужные типа эппендорф объемом 1,5 мл отмеряли по 150 мкл 3,8% раствора натрия цитрата, приготовленного растворением 3,8 г цитрата натрия в 100 мл дистиллированной воды. Для гематологического анализа отбирали 0,5 мл цельной крови. Для определения показателей гемостаза отбирали 1,5 мл цельной крови, далее центрифугированием отделяли плазму. Для биохимического анализа отбирали 1,5 мл цельной крови, далее центрифугированием отделяли плазму. Для изучения клеточности костного мозга на 29 и 43 сутки исследования выделяли бедренную кость, очищали от мягких тканей, костномозговой канал промывали 1 мл 3% уксусной кислоты. Полученный костный мозг суспендировали в растворе уксусной кислоты шприцем через иглы уменьшающегося диаметра.

Подсчет общей клеточности костного мозга

Общее количество миелокариоцитов подсчитывали в камере Горяева и выражали числом клеток на бедро. Для приготовления мазков костного мозга содержимое бедренной кости, вымытое 3% раствором уксусной кислоты из костномозгового канала, помещали на обезжиренное стекло, разводили изологичной сывороткой, затем делали мазок с помощью шлифованного стекла. Высохшие мазки окрашивали, используя краситель-фиксатор Май-Грюнвальда и краситель азурэозин по Романовскому. Подсчитывали миелограмму костного мозга (не менее 500 клеток на стекло). Для оценки морфологии клеточных элементов, определения функциональной активности мегакариоцитов и подсчета миелограммы использовали иммерсионный объектив светового микроскопа (увеличение $\times 100$). Подсчитывали все клеточные элементы, встречающиеся в поле зрения. После дифференцировки 500 клеток, число клеток разного вида делили на 5, результат выражали в процентах:

$$N = \frac{N_{\text{клет.}}}{500} \times 100\%, \quad (4)$$

где:

N – исследуемый клеточный элемент, %;

$N_{\text{клет.}}$ – число клеток одного вида.

Помимо процентного соотношения клеточных элементов, при оценке мазков костномозгового пунктата рассчитывали лейко-эритробластический индекс – соотношение суммы всех клеток:

$$X = \frac{\text{число клеток эритроцитарного ростка}}{\text{число клеток лейкоцитарного ростка}}, \quad (5)$$

где:

X – лейко-эритробластический индекс.

Анализ образцов крови и мочи

В образцах цельной крови с помощью гематологического анализатора Гемалайт 1280 (Dixion, Россия) определяли гематологические показатели крови. Сыворотку для биохимического анализа получали стандартным методом: инкубация при комнатной температуре - 30 мин, центрифугирование - при 3500 об/мин, далее сохраняли при -20 °С в аликвотах. Биохимические исследования сыворотки проводили на анализаторе Erba Mannheim XL-100 (ERBA Mannheim, Германия). Анализы проводили с помощью стандартных наборов реагентов производства компании (ERBA Mannheim, Германия). Образцы исследовали на автоматическом анализаторе мочи Uriskan-strip (Юнимед, Россия) с использованием тест-полосок Check-strip II (Юнимед, Россия). Исследования влияния препарата на свертывающую систему крови проводили с использованием коагулометра АПГ4-03Пх (ГК ЭМКО, Россия).

Патоморфология

Патоморфологическое исследование животных включало в себя макроскопическое исследование, взвешивание органов и выявление отклонений от нормального строения. Некropsию выполнял патоморфолог при участии специалистов по ДКИ. После эвтаназии животные были тщательно обследованы с целью выявления внешних патологических процессов. Было оценено состояние

анатомических полостей, внутренних органов, тканей и их морфологическое строение.

Эвтаназия

После завершения 28-дневного периода введения препарата половина животных каждой группы была подвергнута эвтаназии (5 самцов и 5 самок), на 29 сутки исследования. После завершения 14-дневного восстановительного периода другая половина животных каждой группы была подвергнута эвтаназии (5 самцов и 5 самок), на 43 сутки исследования. Запланированная эвтаназия осуществлялась в CO₂ камере для крыс. Тотальный забор крови для лабораторных исследований осуществляли у крыс из яремной вены в объеме достаточном для исследований клинических показателей.

Некропсия и гистология

При некропсии исследовали внешнее состояние тела, внутренние поверхности и проходы, полость черепа, грудную, брюшную и тазовую полости с находящимися в них органами и тканями, шею с органами и тканями и скелетно-мышечную систему. Для дальнейшего гистологического исследования ткани и органы: аорта; вилочковая железа; влагалище; гардерева железа; гипофиз; глаз; головной мозг; двенадцатиперстная кишка; желудок; кожа; кость с костным мозгом; легкие; лимфатический узел (узлы): матка; молочные железы (только у самок); мочевого пузыря; надпочечники; парашитовидная железа; бедренный нерв; печень; пищевод; подвздошная кишка; поджелудочная железа; почки; придаток яичка; простата; семенной пузырек; сердце; селезенка; скелетные мышцы; слепая кишка; слюнные железы; спинной мозг; толстый кишечник; тощая кишка; трахея; щитовидная железа; яички; яичники; прочие органы и ткани, имеющие макроскопические признаки поражения (патологии); подлежащие ткани в месте введения, фиксировали в 10% забуференном растворе формалина.

Фиксация органов в формалине после забора не менее 72 ч. Окончание фиксации проверяли на срезе - ткани должны быть плотными, кровь - отсутствовать. После окончания фиксации органы вырезали для гистологической проводки в гистологические кассеты. Толщина вырезки 1-2,5 мм, органы

нарезались вдоль. Проводка в изопропаноле восходящей концентрации Изопреп (Biovitrum, Россия). Первые три станции содержат изопреп в концентрациях 70%, 80% и 90%, соответственно. Последующие шесть станций содержат абсолютный изопреп. Время инфильтрации на первой станции 45 мин, в последующих - 1 ч. После девяти станций с изопрепом органы проходят четыре станции с расплавленным парафином Paraplast (Leica, США), по два часа в первых двух, по часу в двух последующих. Суммарное время пропитывания парафином от 6 ч. После окончания проводки органы заливали в парафиновые блоки (Paraplast, Leica) на заливочной станции. Охлажденные парафиновые блоки нарезали на микротоме. Толщина срезов 3 мкм. Полученные срезы переносили на водяную баню для расправления, затем помещали на предметное стекло и просушивали на нагревательном столике в течение получаса при температуре 40 °С, после чего помещали в термостат при 37 °С, на ночь.

На следующий день полученные срезы окрашивали по следующему протоколу:

- термокамера, настроенная на 60 °С в течение 10 мин;
- три станции с ксилолом по 3 минуты;
- три станции со спиртом по 3 минуты, концентрация спирта 96%, 96% и 70%, соответственно;
- промывка в дистиллированной воде 3 мин;
- гематоксилин (Leica, США) в течение 10 мин;
- промывка в дистиллированной воде 3 мин;
- эозин (Leica, США) в течение 2 мин;
- промывка в дистиллированной воде 3 мин;
- три станции со спиртом концентрации 96% по 0,5, 2 и 2 мин, соответственно;
- смесь ксилол-фенол в течение 1 мин;
- две станции с ксилолом по 2 мин.

Окрашенные срезы покрывали покровными стеклами в аппарате для заключения препаратов. Среду для заключения использовали Sub-X Mounting

Medium (Leica, США). Готовые гистологические препараты выдерживали до застывания среды и анализировали под световым микроскопом.

2.4.24 Доклиническое исследование токсичности и местной токсичности при многократном введении препарата VHH-Fc кроликам

В исследовании было использовано 64 кролика породы Шиншилла Советская (32 самца и 32 самки), массой 2,5-3,0 кг. Исследуемый препарат вводили в объемах 0,8 мл/кг, 4,0 мл/кг и 8,0 мл/кг с содержанием действующих веществ 2,4 мг/кг, 12 мг/кг и 24 мг/кг, соответственно (Таблица 8).

Таблица 8 – Дизайн исследования токсичности на кроликах при многократном введении препарата

Путь введения	Количество животных	Доза	Объем введения	Манипуляции
в/в	8♂ + 8♀	2,4 мг/кг	0,8 мл/кг	В/в введение 1 раз/неделю, в течение 28 суток, взвешивание животных до начала введения, на 7, 14, 21, 28, 35, 42 и 45 сутки исследования, регистрация клинической картины ежедневно. На 29, 44 сутки исследования анализ мочи, оценка ССС, поведенческие тесты. Эвтаназия – на 30 (4♂ и 4♀) и 45 (4♂ и 4♀) сутки исследования. На 30, 45 сутки: некропсия, забор крови, оценка местнораздражающего действия.
	8♂ + 8♀	12 мг/кг	4,0 мл/кг	
	8♂ + 8♀	24 мг/кг	8,0 мл/кг	
	8♂ + 8♀	0 мг/кг	8,0 мл/кг	

Критериями оценки являлось состояние животных. Наблюдение за состоянием животных проводили ежедневно, один раз в день. Животных взвешивали на момент начала и окончания карантина, на момент формирования групп, а также на 7, 14, 21, 28, 35, 42 и 45 сутки исследования.

Остальные измерения всех параметров проводились аналогично описанным в разделе «2.4.14 Доклиническое исследование токсичности и местной токсичности при многократном введении препарата VHH-Fc крысам».

2.4.25 Доклиническое исследование иммуотоксических свойств препарата VHH-Fc

В эксперименте по изучению иммуотоксических свойств препарата VHH-Fc на клеточный иммунный ответ в реакции ГЗТ (гиперчувствительность замедленного типа), а также на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов, были использованы мыши (CBA×C57Bl/н) F1. В реакции геагглютинации (гуморальный иммунный ответ) были использованы мыши линии CBA и C57Bl/6.

Мыши гибриды (F1 (CBA×C57Bl/6)), а также мыши линий CBA и C57Bl/6 являются релевантными видами для исследования иммуотоксических свойств, и рекомендованы Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [7]. Использование данного вида животных необходимо для получения объективных данных по безопасности лекарственного средства (ЛС) для получения разрешения на клинические исследования.

Изучение влияния исследуемого препарата на клеточный иммунный ответ в реакции гиперчувствительности замедленного типа

Эксперимент проводили на мышах гибридах F1 (CBA×C57Bl/6) (Таблица 9). Исследуемый препарат и плацебо вводили мышам раз в неделю, внутривенно, в течение 21 суток. В день последнего введения препарата мышей иммунизировали ЭБ (эритроциты барана) (2×10^8) в растворе 0,9% NaCl, в объеме 0,2 мл в межлопаточную область. Вторую инъекцию ЭБ (10^8) в объеме 0,02 мл проводили на 5-е сутки в подушечку правой задней лапы. В левую лапу вводили 0,02 мл

стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Через 24 ч определяли массу обеих лап и рассчитывали индекс реакции (ИР) для каждого животного по формуле:

$$\text{ИР} = (\text{М}_0 - \text{М}_к) \div \text{М}_к \times 100\%, \quad (6)$$

где:

М_0 и $\text{М}_к$ – массы опытной и контрольной лап.

Таблица 9 – Схема эксперимента по изучению влияния препарата VHH-Fc на клеточный иммунный ответ в реакции гиперчувствительности замедленного типа

Животные	Количество животных	Препарат/Доза/Объем введения
Мыши (СВА×С57В1/6) F1	10♂	VHH-Fc/15 мг/кг/0,1 мл/20 г
	10♂	VHH-Fc/75 мг/кг/ 0,5 мл/20 г
	10♂	Плацебо/0,5 мл/20 г

Влияние препарата на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов

Эксперимент проводили на мышах гибридах F1 (СВАхС57В1/6). Исследуемый препарат и плацебо вводили мышам раз в неделю, внутривенно, в течение 21 суток. По окончании введения мышам исследуемого препарата через 24 ч оценивали фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов по интенсивности захвата частиц туши, введенной животным внутривенно в виде 0,05% суспензии в объеме 2 мл. Через 10 мин после введения туши брюшную полость промывали 5 мл изотонического раствора натрия хлорида. Полученные таким образом клетки перитонеального экссудата (КПЭ) отмывали и осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин, ресуспендировали в 1 мл изотонического раствора NaCl. После этого в камере Горяева подсчитывали общее количество перитонеальных макрофагов и количество фагоцитирующих макрофагов. Затем рассчитывали процент фагоцитирующих макрофагов. Схема эксперимента аналогична представленной в Таблице 9.

Определение массы и клеточности органов иммунной системы

Эксперимент проводили на мышах гибридах F1 (CBAxС57ВI/6). Исследуемый препарат и плацебо вводили мышам раз в неделю, внутривенно, в течение 21 суток. После последнего введения через 24 ч подопытных мышей подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации, извлекали тимус, селезенку, лимфатические узлы и трубчатые кости. Лимфатические узлы, тимус и селезенку взвешивали, затем с помощью гомогенизатора готовили клеточную взвесь в растворе Хенкса (рН 7,4), полученную суспензию фильтровали через два слоя капрона и дважды отмывали путем центрифугирования при 200g в течение 5 мин. Раствором 1% цитрата натрия из костей вытесняли и затем гомогенизировали костный мозг. Далее подсчитывали концентрацию ядросодержащих клеток в органе. Схема эксперимента аналогична представленной в Таблице 9.

Реакция гемагглютинации (гуморальный иммунный ответ)

В данном тесте использовали мышей высокоотвечающих на ЭБ – линия CBA, и низкоотвечающих – линия C57ВI/6 (Таблица 10). Исследуемый препарат и плацебо вводили мышам раз в неделю, внутривенно, в течение 21 суток. В день последнего введения препарата мышам вводили внутривенно суспензию трижды отмытых в стерильном изотоническом растворе NaCl ЭБ в субоптимальной дозе, равной 5×10^7 ЭБ/мышь. Через 7 дней после иммунизации животных подвергали эвтаназии, собирали кровь, из которой готовили сыворотку. Далее готовилась серия разведений сыворотки от 1:8 до 1:4096 (с шагом в x2) в 96-луночном планшете. Затем в каждую лунку добавляли ЭБ в концентрации 2×10^8 клеток. Планшеты осторожно встряхивали и ставили в термостат на 2 часа при температуре 37°C. При положительном результате эритроциты оседают на дне лунки планшета в виде зонтика, при отрицательном – в виде пуговки. За титр принимают последнее разведение исследуемой сыворотки, при котором имеется положительный результат. Контрольная лунка должна быть отрицательной.

Таблица 10 – Схема эксперимента по определению реакции гемагглютинации

Животные	Количество животных	Препарат/Доза/Объем введения
Мыши СВА	10♂	VНН-Fc/15 мг/кг/0,1 мл/20 г
	10♂	VНН-Fc/75 мг/кг/ 0,5 мл/20 г
	10♂	Плацебо/0,5 мл/20 г
Мыши С57В1/6	10♂	VНН-Fc/15 мг/кг/ 0,1 мл/20 г
	10♂	VНН-Fc/75 мг/кг/ 0,5 мл/20 г
	10♂	Плацебо/0,5 мл/20 г

Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое и стандартное отклонение. Проводили однофакторный дисперсионный анализ. Рассчитывали непараметрический критерий Краскела-Уоллиса ($p < 0,05$).

2.4.26 Доклиническое исследование аллергизирующих свойств препарата VНН-Fc

В эксперименте по изучению аллергизирующих свойств препарата VНН-Fc были использованы морские свинки альбиносы. Морские свинки альбиносы являются релевантными видами для исследования аллергизирующих свойств, рекомендованы Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [7]. Использование данных видов животных обязательно для получения объективных данных по безопасности ЛС на этапах получения разрешений на клинические исследования и государственной регистрации препарата.

Реакция общей анафилаксии

В тесте общей анафилаксии для морских свинок в качестве высокой дозы была выбрана доза препарата VНН-Fc 6,6 мг/кг (однократный объем введения 0,66 мл на 300 г животного), низкой дозы – 3,3 мг/кг (однократный объем введения 0,33

мл на 300 г животного). При введении сенсibiliзирующей инъекции (суммарная доза препарата) животным высокой дозы эндокардиально вводили объем препарата 1,98 мл на 300 г животного, животным низкой дозы вводили объем препарата 0,99 мл на 300 г животного. Группам морских свинок в тесте общей анафилаксии, получавшим плацебо, вводили объем, соответствующий высокой дозе. В качестве положительного контроля в тесте реакции общей анафилаксии применяли раствор белка куриного яйца (БКЯ, основным аллергическим компонентом которого является овальбумин). Морских свинок иммунизировали перорально 0,6% раствором БКЯ в дозе 4 мл/кг, что составило 1,2 мл на свинку массой 300 г через день, всего 3 раза. Разрешающая эндокардиальная доза БКЯ составила 1 мг на 300 г массы тела (3,33 мг/кг) [7]. В тесте конъюнктивной пробы для морских свинок в качестве высокой дозы была выбрана доза 50 мг/кг (однократный объем введения 5 мл на 300 г животного), низкой дозы – 10 мг/кг (однократный объем введения 1 мл на 300 г животного), т.к. 5 мл является максимальным объемом для введения внутрибрюшинным способом [7]. Схема исследования представлена в Таблице 11.

Таблица 11 – Схема проведения реакции общей анафилаксии

Количество животных	Препарат/ доза / объем, п/к*	Препарат/ доза / объем, в/м*	Препарат/ доза / объем, в/м*	Препарат / разрешающая доза / объем, в/сер
10♂	VНН-Fc / 3,3 мг/кг / 0,33 мл на 300 г			VНН-Fc / 9,9 мг/кг / 0,99 мл на 300 г
10♂	VНН-Fc / 6,6 мг/кг / 0,66 мл на 300 г			VНН-Fc / 19,8 мг/кг / 1,98 мл на 300 г
10♂	Плацебо / 0,66 мл на 300 г			VНН-Fc / 19,8 мг/кг / 1,98 мл на 300 г
10♂	Овальбумин, 0,6% раствор БКЯ – 4 мл/кг			Овальбумин, раствор БКЯ 3,33 мг/кг

Примечание – Символ «*» означает п/о введение для последней группы животных.

Исследуемый препарат вводили по следующей схеме: первая инъекция подкожно, две последующие внутримышечно через день в область бедра. На 21 день после сенсibilизирующей инъекции была проведена эндокардиально разрешающая инъекция исследуемого препарата, либо раствора овальбумина. Плацебо препарата VHH-Fc вводили по схеме, аналогичной введению препарата VHH-Fc.

Одну из групп морских свинок иммунизировали перорально атравматическим зондом для внутрижелудочного введения 0,6% раствором БКЯ в дозе 4 мл/кг, что составило 1,2 мл на свинку массой 300 г через день, всего 3 раза. Разрешающая эндокардиальная доза БКЯ составила 1 мг на 300 г массы тела (3,33 мг/кг).

Учет интенсивности анафилактического шока оценивали в индексах по Weigle [213]. Интенсивность анафилактического шока у каждой морской свинки оценивали по 4- бальной шкале: 4 – гибель, 3 – тяжелый шок, 2 – умеренный шок, 1 – слабый шок, 0 – при отсутствии анафилактоидных реакций. Вычисление анафилактического индекса по Weigle проводилась по следующей формуле:

$$\frac{(N \times 4) + (N_1 \times 3) + (N_2 \times 2) + (N_3 \times 1) + (N_4 \times 0)}{N + N_1 + N_2 + N_3 + N_4}, \quad (7)$$

где:

N – число морских свинок, у которых наступила смерть;

N₁ – число морских свинок, у которых развился тяжелый шок;

N₂ – число морских свинок, у которых развился умеренный шок;

N₃ – число морских свинок, у которых развился слабый шок;

N₄ – морские свинки, у которых не наступило шока.

При гибели всех животных в группе индекс Weigle составляет 4(++++)). При тяжелом шоке – 3(+++), при умеренном шоке – 2(++), при слабом шоке - 1(+), при отсутствии анафилактоидных реакций у морских свинок – индекс равен 0.

Конъюнктивальная проба

Исследование было проведено на морских свинках альбиносах. Животные были разделены на 3 группы животных по 10 голов самцов в каждой (Таблица 12).

Таблица 12 – Схема проведения конъюнктивальной пробы

Животные	Количество животных	Препарат / Доза / Объем, в/б
Морские свинки альбиносы	10♂	VНН-Fc / 10 мг/кг / 1 мл на 300 г
	10♂	VНН-Fc / 50 мг/кг / 5 мл на 300 г
	10♂	Плацебо // 5 мл на 300 г

Морские свинки были сенсibilизированы введением препарата раз в неделю в двух дозах в течение 21 суток способом, приближенным к предполагаемому клиническому использованию – внутрибрюшинно. Контрольным животным вводили Плацебо препарата VНН-Fc. Через сутки после последнего введения препарата была проведена провокационная проба. Для постановки пробы 1 каплю препарата VНН-Fc вводили подопытным и контрольным свинкам в один глаз, во второй глаз была введена 1 капля воды. Реакция учитывалась через 15 мин (гиперчувствительность немедленного типа) и через 48 часов (гиперчувствительность замедленного типа) и оценивалась по следующей шкале (в баллах): 1 – легкое покраснение слезного протока; 2 – покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице; 3 – покраснение всей конъюнктивы и склеры.

Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое и стандартное отклонение.

2.4.27 Клинические исследования безопасности препарата

Первый этап проспективного исследования препарата В11-Fc с открытым периодом подбора дозы с целью изучения безопасности и переносимости проводили в трех группах по 5 человек с последовательной эскалацией дозы.

Для оценки безопасности и иммуногенности проводился отбор биоматериала:

А) Забор образцов мочи:

- для выполнения общего анализа мочи (удельная плотность, прозрачность, рН, глюкоза, белок, эритроциты, лейкоциты, соли, эпителий, слизь) – на скрининге, до введения ИП, через 48 часов после введения ИП, на 7, 14, 28 дни исследования, 6 раз;
- для проведения теста на наркотики и психостимулирующие вещества, 2 раза;
- для проведения теста на беременность (для добровольцев-женщин), 2 раза.

Б) Забор образцов крови:

- для проведения теста на гепатиты В и С, ВИЧ и сифилис однократно на визите скрининга;
- IgE однократно до введения;
- для определения параметров безопасности общий анализ крови (ОАК — гемоглобин, гематокрит, количество тромбоцитов, эритроцитов, лейкоцитов с лейкоцитарной формулой и подсчетом абсолютного и относительного количества лейкоцитов, СОЭ) и биохимический анализ крови (БхАК — общий белок, билирубин, аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспаратаминотрансфераза (АСТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), мочевины, креатинин, глюкоза, лактатдегидрогеназа (ЛДГ), С-реактивный белок (СРБ)) — на скрининге, до введения ИП, через 48 часов после введения ИП, на 7, 14, 28 дни исследования, 6 раз;
- коагулограмма (МНО, АЧТВ, тромбиновое время): до введения ИП, через 48 часов после введения ИП, на 7, 14, 28 дни исследования, 5 раз;

- для оценки иммунологического статуса –популяции Т и В клеток (кол-во и относ. содержание: CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD4/8), классы Ig: IgM, IgG, IgA, IgE — до введения ИП, через 48 часов после введения ИП, на 7, 14, 28 дни исследования, 5 раз;
- для оценки фармакокинетики через 1 час, через 4 часа, 8 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 96 часов, 7 дней, 10 дней, 14 дней, 21 день, 28 дней — 12 раз
- для оценки иммуногенности (антитела к лекарственному препарату, ADA): до введения ИП, на 28 исследования, 2 раза.

Снятие ЭКГ на скрининге, через 48 часов после введения ИП и на 7 день исследования, 3 раза.

Реактогенные свойства оценивали по показателям местных (область места введения препарата) и общих (системные реакции организма на введение препарата) реакций.

Наблюдение и обследование добровольцев осуществляли в соответствии с графиком исследования. Профиль безопасности оценивали по частоте возникновения и выраженности нежелательных реакций, изменениям данных лабораторных (ОАК, БхАК, коагулограмма, иммунный статус, ОАМ) и инструментальных (ЭКГ в 12-ти отведениях) и лабораторных исследований, изменениям параметров функций жизненно важных органов (ЧСС, ЧДД, ТТ, САД, ДАД). Профиль переносимости исследуемых препаратов оценивался по частоте развития общих и местных реакций у добровольцев.

Протокол клинического исследования №-01-B11-FC-2024, версия 1.0 от 30.05.2024, Брошюра исследователя версия 1.0 от 30.05.2024, Информационный листок пациента с формой информированного согласия версия 1.0 от 14.05.2024 были одобрены Советом по Этике при Министерстве здравоохранения Российской Федерации, выписка №361 от 18.06.2024.

Протокол клинического исследования №-01-B11-FC-2024, версия 1.0 от 30.05.2024, Брошюра исследователя версия 1.0 от 30.05.2024, Информационный листок пациента с формой информированного согласия версия 1.0 от 14.05.2024

также были одобрены Локальным этическим комитетом исследовательского центра.

Локальный этический комитет при ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Протокол заседания №221 от 17.07.2024.

Исследование начато в соответствии с Протоколом клинического исследования №-01- В11-FC -2024, версия 1.0 от 30.05.2024.

Исследование начато после получения разрешения на проведение клинического исследования Министерства здравоохранения РФ под контролем Совета по Этике при Министерстве Здравоохранения РФ и в соответствии с трехсторонним соглашением по Надлежащей Клинической Практике (ICH GCP E6 R2) по организации проведения клинического исследования, в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (Форталеза, 2013 г.) и регламентировалось действующим законодательством РФ и прочими регламентирующими документами в текущих редакциях, включая, но не ограничиваясь:

- Федеральный закон от 12.04.2010 г. №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (с изменениями и дополнениями);
- Федеральный закон от 21.11.2011 г. №323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»;
- Конституция РФ;
- Постановление Правительства РФ от 13.09.2010 №714, от 18.05.2011 №393 «Об утверждении Типовых правил обязательного страхования жизни и здоровья пациента, участвующего в клинических исследованиях лекарственного препарата» (с изменениями и дополнениями);
- Приказ Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 г. №200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики»;
- Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 26.08.2010г. №753н «Об утверждении порядка организации и проведения этической экспертизы, возможности проведения клинического исследования

лекарственного препарата для медицинского применения и формы заключения совета по этике»;

- Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23.08.2010г. №703н «Об утверждении формы сообщения о завершении, приостановлении или прекращении клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения»;

- Письмо Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития от 18.12.2009 г. №01И-889/09 «О базе данных по клиническим исследованиям лекарственных средств»;

- Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том 1.М.: Гриф и К, 2013-328 с;

- Методические рекомендации «Мониторинг нежелательных реакций при проведении клинических исследований» (утв. Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития 05.10.2009 г.);

- Федеральный закон от 27.07.2006 №152-ФЗ «О персональных данных»;

- Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ R 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика»;

- Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17 июля 2018 г. N 11 «О Руководстве по общим вопросам клинических исследований»;

- Соглашение о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза от 23 декабря 2014 года;

- Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 79 «Об утверждении Правил надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза»;

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Создание кандидатного препарата на основе модифицированного однодоменного антитела и разработка технологии его получения

На первом этапе работы из предварительно отобранных клонов однодоменных антител В11 и G3 были получены модифицированные Fc-фрагментом антитела В11-Fc и G3-Fc. Далее была изучена их специфическая нейтрализующая активность в отношении ботулинического нейротоксина типа А и отобрано наиболее перспективное антитело В11-Fc для дальнейшего получения кандидатного препарата на его основе.

На следующем этапе работы, на основе антитела В11-Fc был получен препарат для экстренной профилактики и терапии ботулизма, вызванного ботулотоксином типа А. Для этого была получена клеточная линия СНО, стабильно продуцирующая антитело В11-Fc, отработана технология культивирования, создан исследовательский банк. Кроме того, была разработана технология очистки антитела В11-Fc и изучены характеристики очищенного препарата В11-Fc.

3.1.1 Получение и характеристика препарата ботулинического токсина типа А

Для получения ботулинического токсина типа А проводили очистку культуральной жидкости, полученной в результате культивирования *C.botulinum* А98 в течение 5 суток. В результате был получен препарат ботулотоксина типа А, обладающий высокой степенью чистоты (Рисунок 7).

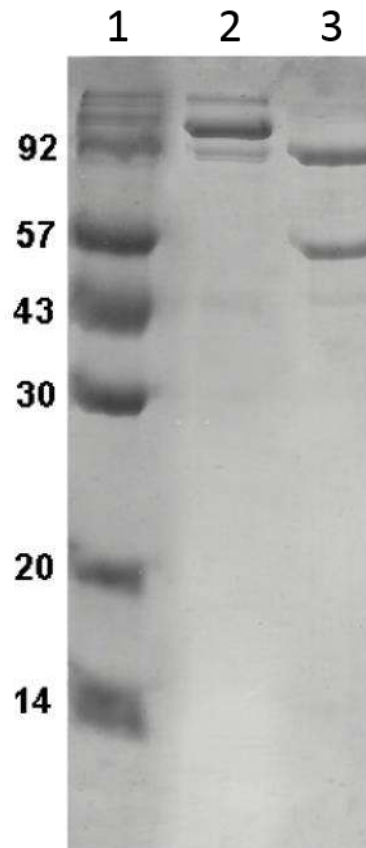


Рисунок 7 – Электрофореграмма препарата ботулинического токсина типа А. 1 – маркер молекулярного веса, 2 – препарат ботулотоксина А в невосстанавливающих условиях, 3 – препарат ботулотоксина А в восстанавливающих условиях.

В результате оценки токсической активности полученного препарата на мышах BALB/c (10 мышей в группе) была показана удельная активность LD₅₀ препарата 0,625 нг/кг (Таблица 13).

Таблица 13 – Результаты оценки удельной активности препарата ботулотоксина типа А

Доза ботулотоксина, нг/кг	0,500	0,625	0,750	0,875
Выживаемость группы мышей, %	80	50	30	0

Таким образом был получен и охарактеризован препарат ботулинического токсина типа А, обладающий высокой удельной токсической активностью.

3.1.2 Получение панели однодоменных антител и отбор нейтрализующих клонов

Однодоменные антитела В11 и G3 были получены ранее н.с. Годаковой С. А. [90] в лаборатории иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России. При помощи пятикратной иммунизации альпака препаратом анатоксина, состоящего из ВоNT/A и небольшого количества гемагглютининов, смешанного с адьювантом Фрейнда, была получена иммуногенная сыворотка крови с высоким уровнем специфических антител. Из иммуногенной сыворотки проводили выделение лимфоцитов, дальнейшее выделение РНК, синтез кДНК и ПЦР-амплификацию последовательностей VHH. При помощи метода фагового дисплея проводили отбор и селекцию перспективных VHH на нативном и денатурированном ВоNT/A. Для проверки нейтрализующей активности и специфичности VHH проводили анализ нейтрализации ВоNT/A *in vivo*, на летальной модели внутрибрюшинной интоксикации мышей. Таким образом, клоны однодоменных антител В11 и G3 были выбраны как наиболее перспективные для дальнейшего исследования.

3.1.3 Получение модифицированных однодоменных антител В11-Fc и G3-Fc, и изучение их нейтрализующей активности в отношении ботулотоксина типа А

На основе отобранных клонов однодоменных антител В11 и G3, специфичных к ботулиническому токсину типа А, при помощи генно-инженерных методов были получены формы однодоменных антител, слитых с Fc-фрагментом IgG1 человека. В результате оценки нейтрализующей активности очищенных модифицированных однодоменных антител было показано, что антитела В11-Fc и G3-Fc обладают полной нейтрализующей активностью против 5 LD₅₀ ВоNT/A в концентрациях 0,001 и 0,1 мкг/мышь соответственно, в то время как не модифицированные формы антител не обеспечивали полной нейтрализации ВоNT/A. Кроме этого, при оценке нейтрализующей активности антител против 100

LD₅₀ ВоNT/A была показана более эффективная нейтрализация антителом В11-Fc в более низкой дозе.

Изучение длительности циркуляции показало, что модифицированные варианты антител имеют более чем в 80 раз продолжительнее фармакокинетику, чем не модифицированные однодоменные антитела. После этого, при изучении нейтрализующей активности антител В11-Fc и G3-Fc против 100 LD₅₀ ВоNT/A были получены результаты, демонстрирующие, что антитело В11-Fc является наиболее перспективным.

При оценке фармакокинетики изучаемых антител было показано, что при использовании вводимой дозы 5 мг/кг, антитело В11-Fc имело более длительный период полувыведения.

Таким образом, исходя из полученных результатов, данное антитело было выбрано для дальнейшей работы.

3.1.4 Дизайн генетической конструкции, кодирующей антитело В11, слитое с Fc-фрагментом человеческого IgG1

Нуклеотидная последовательность гена, кодирующего антитело В11, была любезно предоставлена н.с. лаборатории иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, к.б.н. Годаковой С.А. Для повышения протективности отобранного клона антитела за счет увеличения времени его циркуляции в крови и/или дополнительной функциональности синтезировали модифицированную конструкцию В11-Fc, содержащую Fc-фрагмент IgG1 человека. Для этого, при помощи методов *in silico* в программе Geneious Prime был разработан дизайн генетической конструкции, содержащей последовательность антитела В11, связанную с последовательностями тяжелой цепи IgG1 (регионы SP, hinge, CH2 и CH3) (модифицированное антитело В11-Fc) (Рисунок 8). Нуклеотидные последовательности элементов модифицированного антитела В11-Fc получали с помощью базы данных последовательностей белков UniProt [205]; использованные последовательности представлены в Таблице 14.



Рисунок 8 – Схематичное изображение полученной генетической конструкции, содержащей ген модифицированного антитела B11-Fc. SP – сигнальный пептид, обеспечивающий секрецию антитела в культуральную жидкость; B11 – однодоменное антитело, специфичное к BoNT/A; Hinge – шарнирный регион человеческого IgG1; CH2 и CH3 – домены тяжелой цепи человеческого IgG1.

Таблица 14 – Нуклеотидные последовательности антитела B11 и регионов hinge, CH2, CH3 IgG1 человека в составе модифицированного антитела B11-Fc

Нуклеотидная последовательность SP	ATGGGCTGGAGTCTGATCCTTCTGTTCCCTCGTTGCA GTTGCCACCAGAGTGTTGAGT
Нуклеотидная последовательность антитела B11	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGAGCGGT GCAGGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGACGCTCCTCCAGTAGCTATGGCATGGGCTG GTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGT AGCAGCTATTAAGTGGAGTGGTGGTAGCACACACTA TGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAG AGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGA ACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACT GTGCAGCAACCCTCGGGGGTТАCTACTATATATATG AGTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACTG TCTCCTCAAGCTCC
Нуклеотидная последовательность Hinge IgG человека	ACAGTGAGATCTGACAAGACCCACACCTGTCCACC TTGTCCTGCTCCAGAGCTGCTTGGAGGTCCA

<p>Нуклеотидная последовательность CH2 IgG человека</p>	<p>GCTCCAGAGCTGCTTGGAGGTCCAAGCGTGTTCTG TTCCTCCCAAACCTAAGGACACCCTGATGATCTCC AGGACACCAGAAGTGACCTGTGTCGTTGTGGACGT CTCTCACGAGGATCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTA TGTGGATGGTGTGGAGGTCCACAATGCCAAGACCAA ACCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGAGT CGTGAGTGTGTTGACCGTGCTGCATCAAGACTGGCTG AATGGCAAGGAATATAAGTGCAAAGTGAGCAACAAA GCACTTCCTGCTCCCATCGAGAAGACCATCTCCAAAG CCAAA</p>
<p>Нуклеотидная последовательность CH3 IgG человека</p>	<p>GGACAACCTAGAGAACCTCAAGTCTACACCCTGCCA CCCTCCAGAGAAGAGATGACCAAAAACCAAGTGTC TCTGACCTGTCTTGTCAAAGGCTTCTATCCCTCTGAC ATTGCTGTGGAGTGGGAGAGCAATGGACAACCTGA GAACAACCTATAAGACCACACCACCTGTCCTGGACAG TGATGGCTCCTTCTTTCTGTATAGTAAGCTGACAGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAAGGCAATGTCTTCTCC TGCAGTGTGATGCATGAAGCCTTGCACAACCACTACA CCCAGAAGAGCCTGTCTTTGTCTCCTGGCAAG</p>

Наличие в генетической конструкции сигнального пептида SP тяжелой цепи IgG1 человека обеспечивает посттрансляционный транспорт антитела во внеклеточную среду, последовательности Hinge IgG1 человека - связывание структурных областей антитела.

Нуклеотидная последовательность полученной генетической конструкции была синтезирована ЗАО «Евроген» в составе вектора pAL-TA. Ген VHH-Fc клонировали в плазмиду pVACP по сайтам рестрикции NheI и HindIII, в результате чего была получена плазида pVACP-B11-Fc (Рисунок 9), которую использовали в дальнейшей работе.

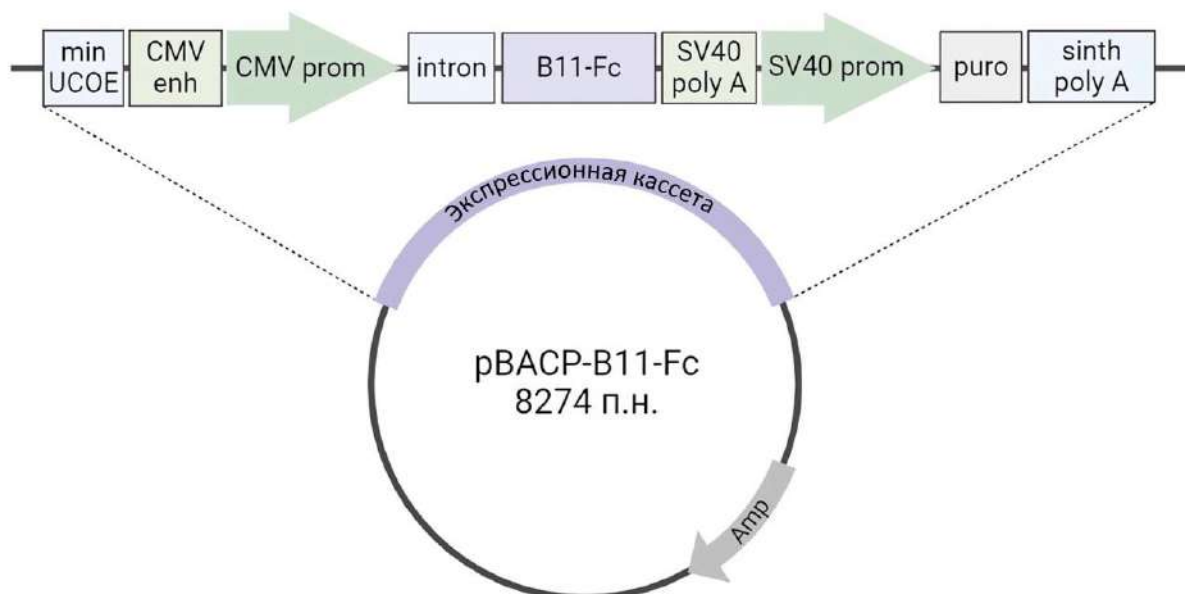


Рисунок 9 – Схематичное изображение полученной плазмидной конструкции, содержащей ген B11-Fc.

Плазмидная конструкция pVACP-B11-Fc содержит гены антибиотикорезистентности к ампициллину и пурамицину для селекции в прокариотах и эукариотах соответственно. Последовательность EF1a представляет собой гибридный промотор, содержащий основную часть от человеческого фактора элонгации и CMV энхансера. Данный промотор обеспечивает высокий уровень экспрессии генов в эукариотических клетках. В качестве терминирующей последовательности использовали сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста, обеспечивающий высокий уровень экспрессии генов.

3.1.5 Получение клона-продуцента, стабильно продуцирующего антитело B11-Fc

Для получения клона-продуцента, стабильно продуцирующего антитело B11-Fc, была использована клеточная линия СНО, полученная из коллекции ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, поскольку она является высокопродуктивной, а продукты ее экспрессии – безопасными для человека [3]. Для этого целевую pVACP-B11-Fc плазмидную ДНК линеаризовали с

использованием эндонуклеазы рестрикции Alw44I. Положительный результат гидролиза был подтвержден с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле (Рисунок 10).

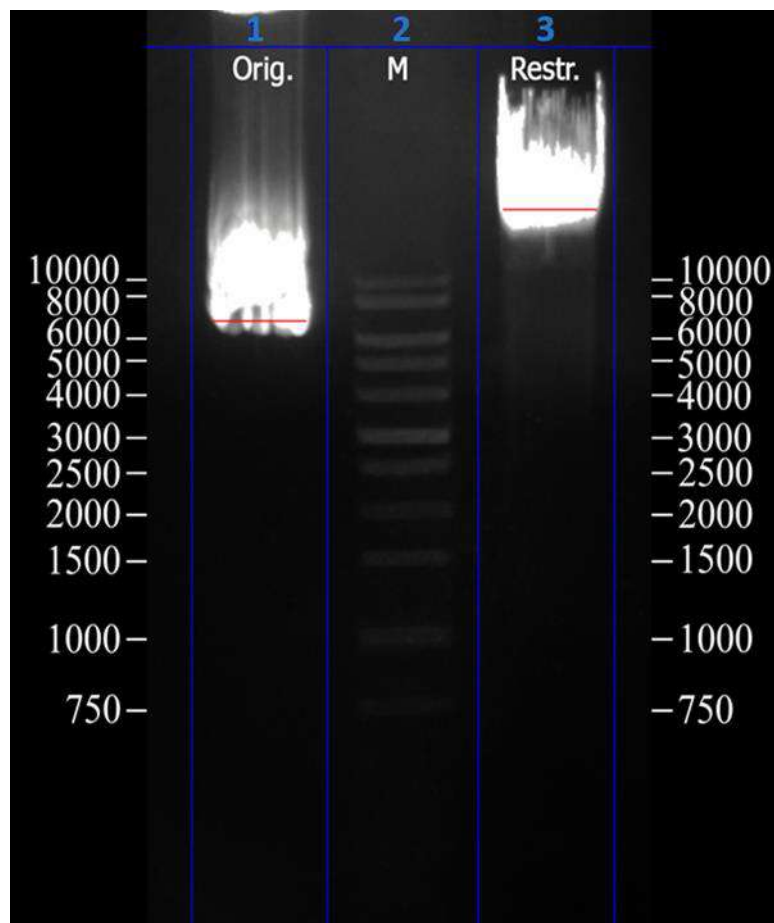


Рисунок 10 – Электрофореграмма плазмидной ДНК рВАСР-В11-Fc гидролизованной по Alw44I в сравнении с исходной ДНК. 1 – исходная рВАСР-В11-Fc, 2 – маркер молекулярного веса, 3 – рВАСР-В11-Fc гидролизованная по Alw44I. Линейная форма ДНК имеет меньшую подвижность в агарозном геле, чем скрученная кольцевая форма плазмиды [40].

Трансфекцию проводили с использованием клеток СНО в 6-луночном планшете. Второй планшет (с нетрансфицированными клетками СНО) использовали в качестве контроля селекции.

Оценку эффективности трансфекции проводили спустя 24 часа после проведения трансфекции с помощью флуоресцентного микрофотографирования, по

интенсивности флуоресценции белка EGFP в лунках с клетками, трансфицированными контрольной плазмидной ДНК рVACP-EGFP (Рисунок 11). В результате было показано, что уровень эффективности трансфекции составляет 60-80%.

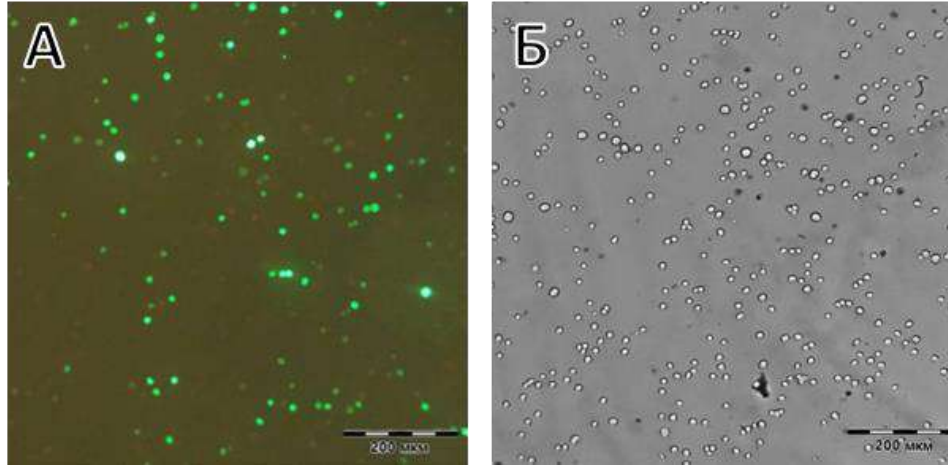


Рисунок 11 – Клетки СНО спустя 24 часа после трансфекции контрольной плазмидой рVACP-EGFP. А – клетки при УФ микроскопии, Б – клетки при световой микроскопии.

Через 7 суток селекции трансфицированных клеток целевой плазмидной ДНК проводили рассев на 96-луночные культуральные планшеты для отбора моноклона-продуцента. Через 14 суток наблюдали образование фокусов роста из единичных клеток. Путем анализа концентрации экспрессируемых антител в образцах культуральной жидкости из лунок отобрали 24 клон-продуцента, имевших наиболее высокую концентрацию антител на клетку. Далее аналогичным образом было отобрано 5 наиболее продуктивных клонов, которые анализировали ИФА с помощью набора общий-ИФА-БЕСТ, как описано в методах (Таблица 15), вертикального белкового электрофореза в ПААГ в восстанавливающих условиях (Рисунок 12, А) и иммуноблоттинга в восстанавливающих условиях (Рисунок 12, Б).

Таблица 15 – Результат количественной оценки концентрации антител в культуральной жидкости различных моноклонов

Название моноклона	Концентрация антител в культуральной жидкости, мкг/мл
В7	98
С9	52
8	78
24	87
В9	64

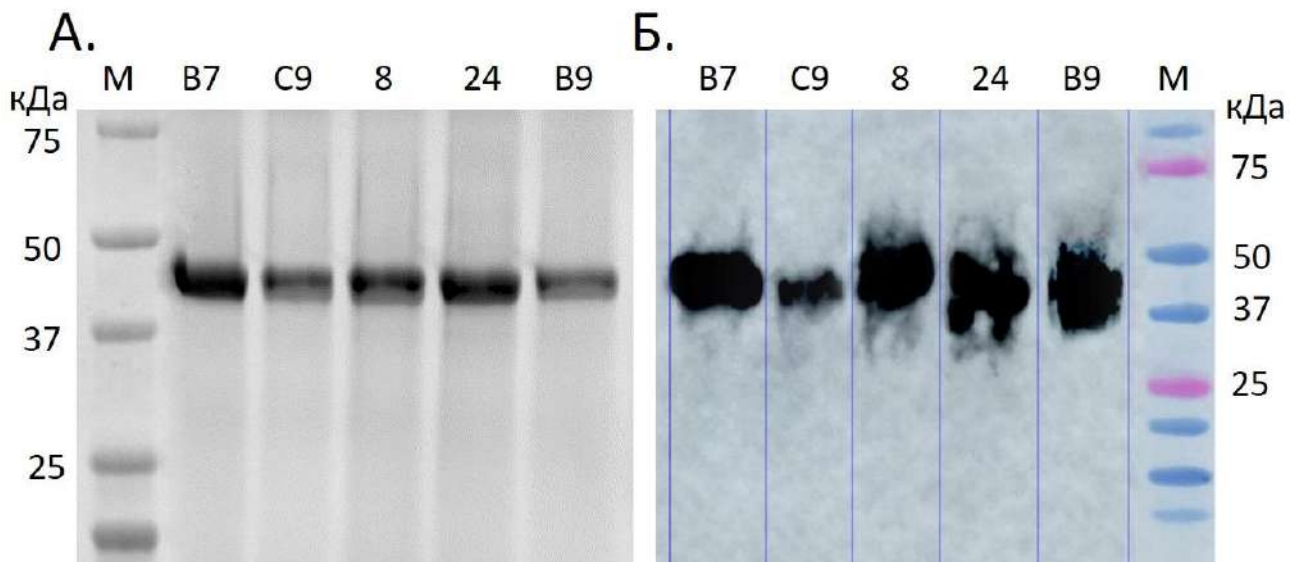


Рисунок 12 – Электрофореграмма (А) и снимок иммуноблота (Б) культуральной жидкости от различных клонов-продуцентов, отобранной из культуральных флаконов 25 см² при плотности клеток $\sim 3 \cdot 10^6$ клеток/мл. Численными и буквенными обозначениями показаны условные названия клонов-продуцентов. М – маркер молекулярной массы. Одиночный фрагмент соответствует ~ 40 кДа.

В результате, все исследуемые моноклоны-продуценты показали отсутствие значимых количеств посторонних белковых примесей в культуральной жидкости, содержащей антитело В11-Fc. На основании данных продуктивности каждого из

продуцентов, для дальнейшей работы был выбран клон В7, имеющий наивысший уровень продукции антитела В11-Fc. Далее, полученный клон-продуцент культивировали в суспензионных условиях в колбах.

Таким образом, был получен стабильный клон-продуцент В7, обладающий высоким уровнем стабильной продукции антитела В11-Fc высокой чистоты.

3.1.6 Исследование генетической стабильности клона-продуцента антитела В11-Fc. Создание системы банков

Путем постепенного увеличения концентрации клеток и объема среды создавали систему банков клона-продуцента. На первом этапе был создан исследовательский банк клеток клона В7. Затем ампулы из исследовательского банка исследовали на генетическую стабильность и присутствие контаминантов. После подтверждения генетической стабильности и отсутствия контаминантов из исследовательского банка создавали рабочий банк клеток.

В результате, на данном этапе был создан исследовательский банк клона-продуцента В7 антитела В11-Fc в количестве 200 ампул на 22 пассаже от момента получения отдельных клонов на 96-луночных планшетах.

В результате исследования генетической стабильности полученного клона В7 не было выявлено существенных различий в уровне экспрессии антитела В11-Fc при культивировании в течение 60 пассажей (Рисунок 13). Таким образом, уровень экспрессии антитела В11-Fc клоном-продуцентом В7 остается неизменным в течение времени и не снижается в течении длительного пассирования.

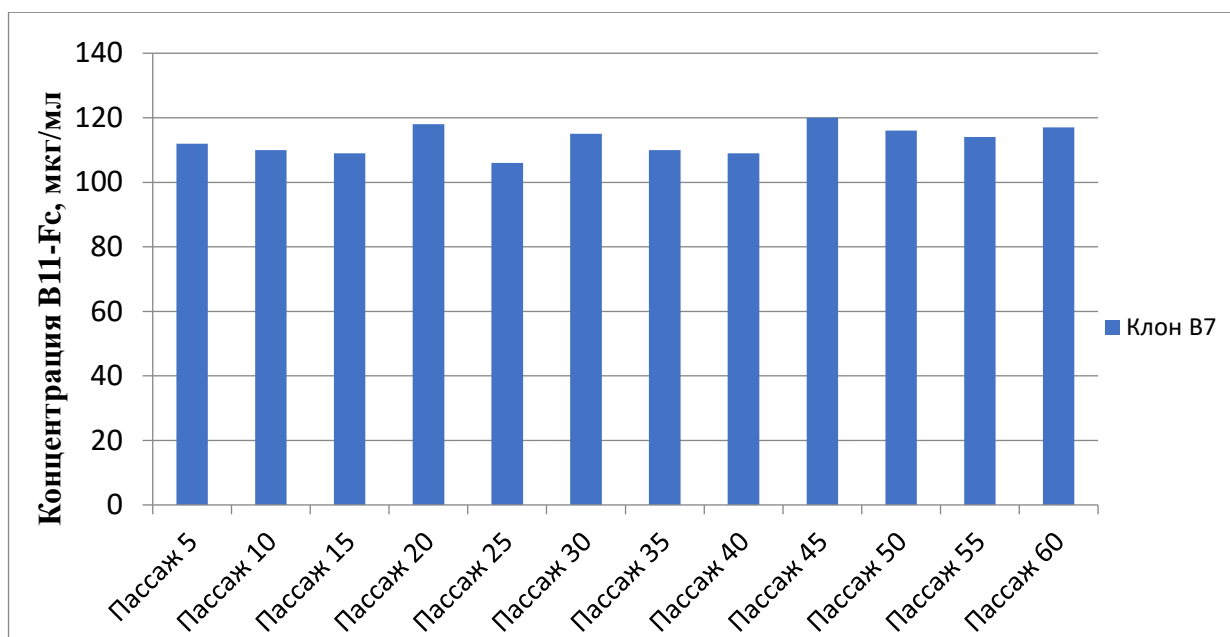


Рисунок 13 – Динамика изменения концентрации антитела B11-Fc, экспрессируемого клоном B7, в течение 60 пассажей.

После подтверждения генетической стабильности и отсутствия контаминантов был создан рабочий банк клеток, аналогично исследовательскому банку, в количестве 250 криоампул. В результате исследования полученных банков клеток на стерильность, наличие микоплазм и вирусной контаминации было показано полное отсутствие посторонних агентов. Таким образом, данный клон-продуцент был криоконсервирован в форматах исследовательского и рабочего банков для использования в дальнейших исследованиях.

3.1.7 Оптимизация процесса культивирования для продукции антитела B11-Fc

Оптимизацию процесса культивирования для продукции антитела B11-Fc проводили в колбах Эрленмейера с рабочим объемом 50 мл. В ходе наращивания клеточной биомассы выживаемость клеток держалась на уровне 95-100%. Клетки высевали в объем питательных сред 25 мл с концентрацией $1,0 \cdot 10^6$ клеток/мл. При достижении плотности $3,0-5,0 \cdot 10^6$ клеток/мл начинали добавление подпиток. Схема эксперимента и полученные результаты показаны в Таблице 16.

Таблица 16 – Схема процесса культивирования, показатели концентрации клеток, их выживаемости и концентрация антитела в каждый день продукции

Среда / подпитка	Показатель	Срок культивирования, сут								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
SFM4CHO + CellBoost 5	Концентрация клеток, клеток/мл	3,2	7,2	9,4	9,9	9,9	9,8	9,6	8,8	-
	Выживаемость, %	99	100	100	99	98	96	93	84	-
	Объем подпитки, %	4	6	8	10	10	10	8	-	-
	Концентрация антитела, мкг/мл	9	14	28	66	126	163	219	352	-
ActiPro + CellBoost 5	Концентрация клеток, клеток/мл	4,1	9,2	13,1	13,4	13,5	13,5	13,3	13,1	11,2
	Выживаемость, %	99	100	100	100	100	99	98	96	85
	Объем подпитки, %	4	6	8	10	10	10	8	7	-
	Концентрация антитела, мкг/мл	7	12	27	67	152	188	256	397	447
SFM4CHO + CellBoost 7a + CellBoost 7b	Концентрация клеток, клеток/мл	3,2	7,7	9,9	11,1	11,3	11,4	11,2	10,6	8,4
	Выживаемость, %	99	100	100	100	99	97	95	90	83
	Объем подпитки 7a, %	1	1	1,5	2	2,5	2,5	2,5	2	-
	Объем подпитки 7b, %	0,1	0,1	0,15	0,2	0,25	0,25	0,25	0,2	-
	Концентрация антитела, мкг/мл	7	11	25	51	154	203	331	437	516
ActiPro + CellBoost 7a + CellBoost 7b	Концентрация клеток, клеток/мл	4,1	10,5	14,6	14,8	14,9	14,8	14,6	13,2	11,9
	Выживаемость, %	99	100	100	99	100	99	97	93	86
	Объем подпитки 7a, %	1	1	2	2,5	3	3	2,5	2,5	-
	Объем подпитки 7b, %	0,1	0,1	0,2	0,25	0,3	0,3	0,25	0,25	-
	Концентрация антитела, мкг/мл	8	13	28	59	181	237	370	534	608

Таким образом, в результате культивирования клона-продуцента В7 в различных условиях была подобрана оптимальная схема процесса культивирования. Данную схему в дальнейшем использовали для получения антитела В11-Fc.

3.1.8 Разработка технологии очистки модифицированного однодоменного антитела V11-Fc

Общепринятым подходом для первой стадии очистки антител является аффинная хроматография с использованием сорбентов на основе белков А или G.

Аффинная хроматография — это разновидность адсорбционной хроматографии. Основной особенностью аффинной хроматографии является наличие комплементарности между иммобилизованным на матрице лигандом и вторым партнером пары взаимодействующих компонентов, который извлекается из смеси с другими, не комплементарными лиганду веществами. Использование высокоизбирательного взаимодействия позволяет за одну стадию достичь очень высокой степени очистки искомого вещества. Аффинное взаимодействие является нековалентным и может быть ослаблено путем изменения рН, ионной силы раствора, введения в раствор веществ, препятствующих образованию комплементарных связей. Важными преимуществами аффинной хроматографии является высокая избирательность, эффект концентрирования искомого вещества на аффинной матрице и освобождение от гидролитических ферментов. Аффинная очистка часто позволяет сохранить нативную структуру вещества. Способность белка А связываться с Fc-фрагментом иммуноглобулинов позволяет его использовать для создания сорбентов, применяемых с целью очистки антител.

Анионообменная хроматография — применяется обычно как второй этап очистки V11-Fc. С этой целью используют сорбенты с четвертичным амином, обладающие сильными анионообменными свойствами. При данном методе рекомбинантные антитела обычно не взаимодействуют с сорбентом, тогда как остаточные белки и ДНК штамма-продуцента, отрицательно заряженные агрегаты прочно связываются с четвертичным амином.

В качестве завершающего этапа очистки в лабораторном масштабе часто используют эксклюзионную хроматографию, основанную на разделении веществ по размеру за счет различной способности проникать в поры неподвижной фазы. С помощью эксклюзионной хроматографии, в случае разделения антитела V11-Fc от

примесей и агрегатов, был показан хороший результат очистки (данные не представлены), однако данный метод является трудномасштабируемым.

Помимо эксклюзионной хроматографии могут использоваться сорбенты, обладающие мультимодальными свойствами. Одним из таких сорбентов является *Capto adhere* (Cytiva, США), в котором в качестве лиганда используется N-бензил-N-метилэтаноламин, обеспечивающий сильные анионообменные свойства. При очистке антитела B11-Fc было показано (данные не представлены) присутствие большого количества агрегатов в очищенном препарате. Таким образом был сделан вывод о низкой эффективности такого способа очистки.

Очистка с помощью гидроксиапатита является методом, в котором используют нерастворимый гидроксилированный фосфат кальция, образующий матрицу и лиганд. Функциональные группы состоят из пар положительно заряженных ионов кальция и отрицательно заряженных фосфатных групп. Как следствие, гидроксиапатит обладает особенностью связывать макромолекулы на основе сродства к металлам через атомы кальция и ионных взаимодействий, поэтому антитела могут удерживаться на колонке в зависимости от их заряда и pH. Таким образом, при использовании данного типа очистки, можно добиться 95-99% чистоты препарата.

Путем аффинной хроматографии культуральной среды на колонке MabSelect SuRe 1 мл проводили очистку антитела B11-Fc из объема культуральной среды 100 мл, предварительно разбавленной 1:1 со связывающим буферным раствором, полученной на 9 день культивирования стабильного клона-продуцента B7 на среде ActiPro с подпитками CellBoost 7a и 7b. Элюирование проводили раствором 20 mM цитрата натрия (pH=2,8). Однако при использовании данного раствора визуально наблюдали агрегацию антител, поэтому в дальнейшей работе использовали раствор 200 mM глицина (pH=2,8). Пример хроматографической очистки на аффинном сорбенте показан на Рисунке 14 (А).

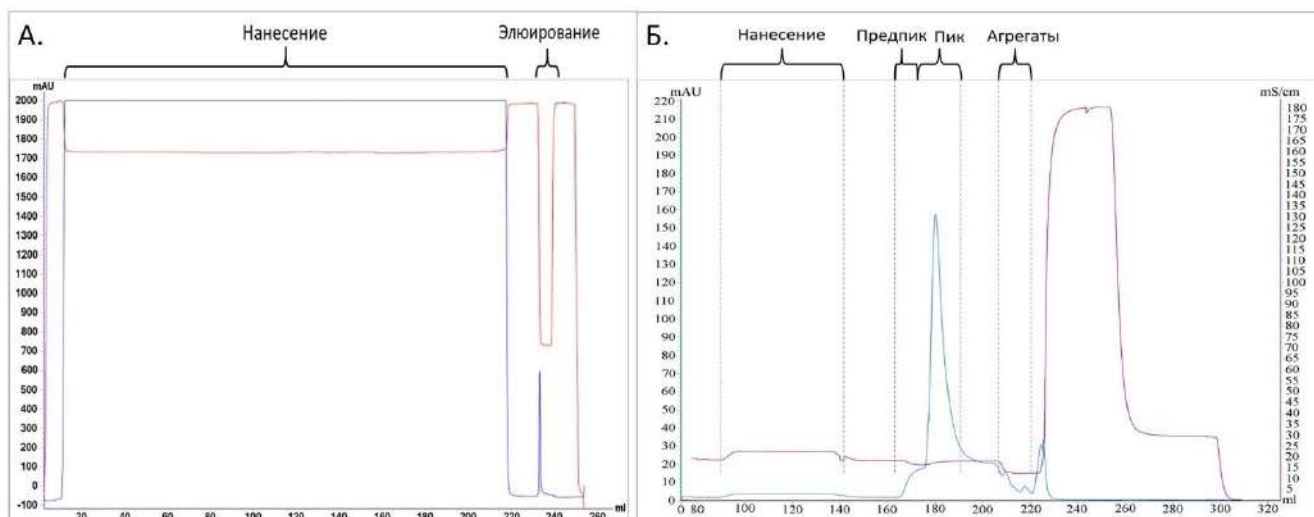


Рисунок 14 – Хроматограмма очистки антитела B11-Fc на сорбенте MabSelect SuRe с использованием элюирующего раствора глицина (А) и на сорбенте гидроксипатит (Б).

В результате очистки антител было получено 4 фракции антитела B11-Fc, концентрацию которых измеряли спектрофотометрически на NanoDrop 2000с при 280 нм. Суммарный выход антител со 110 мл составил 59,3 мг. Элюированные фракции анализировали при помощи вертикального электрофореза в ПААГ (Рисунок 15). В результате было продемонстрировано, что пиковые фракции соответствуют по подвижности однодоменному антителу, слитому с Fc-фрагментом IgG (VHH-Fc) (около 40 кДа в восстановленных условиях и около 80 кДа в невосстановленных).

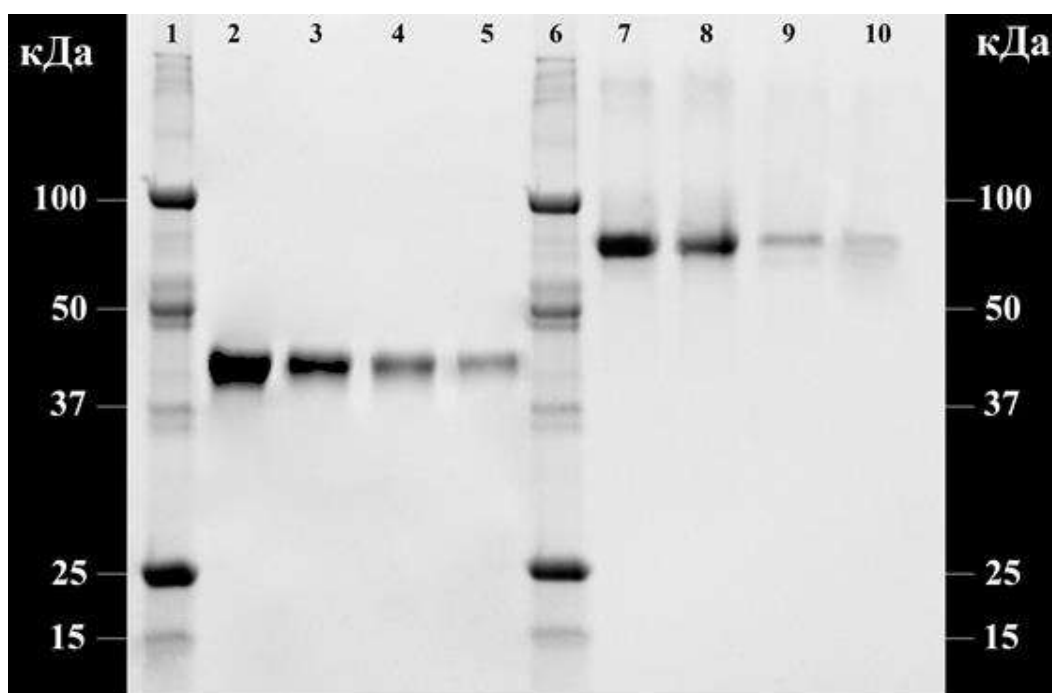


Рисунок 15 – Электрофореграмма пиковых фракций аффинной очистки антитела В11-Fc. 1, 6 – маркер молекулярного веса, 2-5 – пиковые фракции в восстанавливающих условиях, 7-10 – пиковые фракции в невосстанавливающих условиях.

Далее полученные фракции после аффинной очистки объединяли и проводили анионообменную очистку с использованием Sartobind Q Nano 3 мл. Концентрацию полученных фракций измеряли спектрофотометрически на NanoDrop 2000с при 280 нм. Суммарный выход антител составил 56,6 мг. Чистоту анализировали при помощи вертикального электрофореза в ПААГ.

После этого, фракции В11-Fc очищали с использованием гидроксиапатита (Рисунок 14, Б). Концентрацию полученных фракций измеряли спектрофотометрически на NanoDrop 2000с при 280 нм. Чистоту анализировали при помощи вертикального электрофореза в ПААГ (Рисунок 16). Суммарный выход антитела В11-Fc составил 55,4 мг.

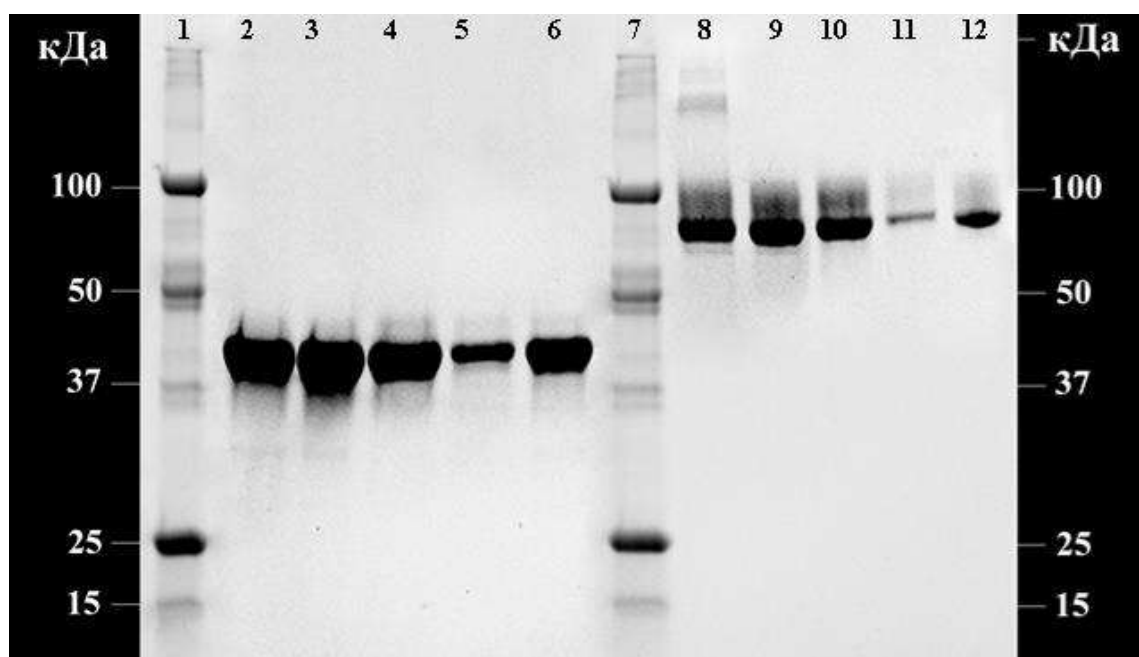


Рисунок 16 – Электрофореграмма фракций очистки антитела В11-Fc на гидроксипатите в восстанавливающих (2-6) и невосстанавливающих (8-12) условиях. 1, 7 – маркер молекулярного веса; 2, 8 – фракция агрегатов; 3, 9 – целевая фракция; 4, 10 – предпик целевой фракции; 5, 11 – проскок; 6, 12 – фракция до очистки.

После осуществления противовирусной фильтрации очищенного препарата проводили подбор формулирующего буфера. В результате исследования раствора, содержащего 150 мМ NaCl, 15 мМ Na₂HPO₄, 5 мМ NaH₂PO₄, 0,01% твин-80, рН=7,2 была показана стабильность антитела В11-Fc при хранении в течение 1 года при 4 °С методом ускоренного старения препарата.

Таким образом была оптимизирована методика очистки антитела В11-Fc при помощи аффинной, анионообменной и мультимодальной хроматографии. Средний выход очищенного антитела В11-Fc составил около 500 мкг на 1 мл культуральной жидкости. Был подобран состав формулирующего раствора, обеспечивающего длительное хранение препарата.

3.2 Изучение физико-химических и иммунологических характеристик кандидатного препарата

С целью первичной характеристики полученного кандидатного препарата *in vitro* проводили изучение его чистоты, подлинности, а также функциональной активности Fc-рецептора.

3.2.1 Исследование чистоты препарата В11-Fc и определение гликанового профиля

Целостность молекулы и содержание примесей в препарате антитела В11-Fc оценивались методом ВЭЖХ. В результате, на хроматограмме исследуемого образца детектировался один основной пик, соответствующий мономерной форме В11-Fc (Рисунок 17). При этом на хроматограмме отсутствовали видимые пики примесных белков.

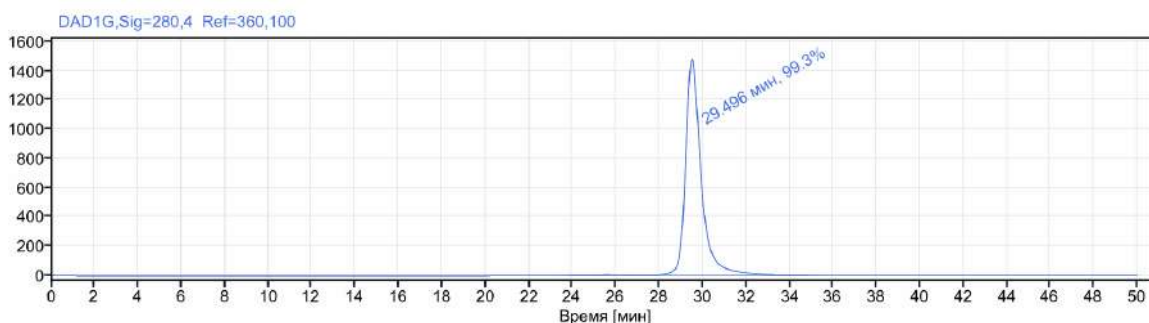


Рисунок 17 – Результаты исследования чистоты препарата антитела В11-Fc методом ВЭЖХ.

Исследование чистоты методом определения размера наночастиц в растворе позволяет не только определить размер молекул и наличие их олигомеров, но и детектировать более крупные агрегаты частиц, которые не определяются методом электрофореза из-за невозможности миграции крупных комплексов в геле, а также могут не определяться методом ВЭЖХ в свободном объеме из-за их задержки на предфильтрах хроматографической системы. В результате измерения было показано присутствие одного основного пика, соответствующего молекулам

со средним диаметром 7,85 нм, что согласуется со средним размером молекул VHH-Fc (Рисунок 18).

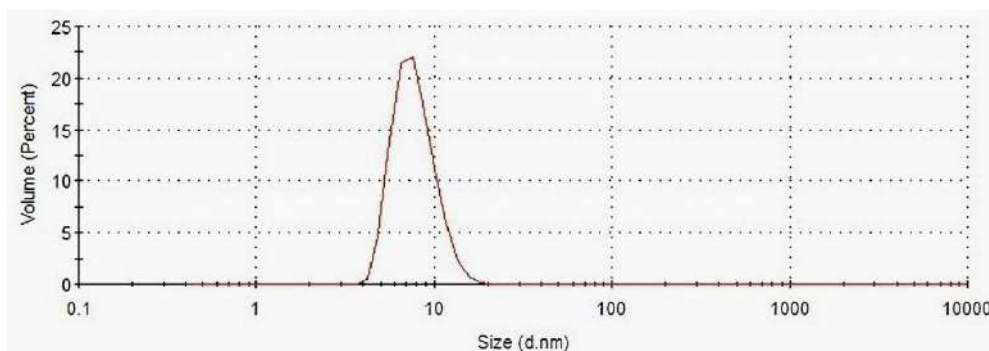


Рисунок 18 – Результаты исследования методом определения размера наночастиц в растворе.

В результате исследования наличия остаточной ДНК штамма-продуцента методом ПЦР в реальном времени было установлено, что ее количество не превышает допустимую норму 10 пг/мг целевого антитела.

При исследовании наличия остаточных белков штамма-продуцента методом ИФА было установлено, что количество их количество не превышает допустимую норму 1 мкг/мг целевого антитела.

В результате изучения наличия остаточного белка А методом ИФА было показано, что его количество не превышает допустимую норму 25 нг/мг целевого антитела.

При исследовании пирогенности препарата антитела V11-Fc было установлено, что препарат не содержит бактериальных эндотоксинов и является апирогенным.

При исследовании гликанового профиля препарата антитела V11-Fc было показано, что содержание маннозилированных форм гликанов составляет от 1 до 5% в зависимости от серии препарата (Таблица 17). Также препарат содержит афукозилированные гликаны и не содержит высокогалактозилированных форм.

Таблица 17 – Процентное содержание гликанов в препарате B11-Fc

Группа гликанов	Количественное содержание в препарате
G0-N	0-2%
G0F-N	0-2%
G0	0,5-5%
G0F	30-50%
Man5	1-5%
G1	1-5%
G1F	15-25%
G2F	5-15%
G2+G2	0%

В результате исследований была продемонстрирована однородность очищенного препарата антитела B11-Fc и высокая чистота. В образцах наблюдался преимущественно один пик и отсутствие каких-либо значимых примесей. Было показано отсутствие высокогалактозилированных форм гликанов, которые потенциально могут повышать иммуногенность препарата.

3.2.2 Измерение аффинности взаимодействия Fc-фрагмента антитела B11-Fc с разными классами Fc рецепторов

Для изучения функциональной активности Fc-фрагмента антитела B11-Fc проводили анализ его взаимодействия с белками FcRn, CD16a, CD16b, CD32a, CD32b, γ RI человека, являющихся мишенями для связывания с Fc-фрагментом человеческих иммуноглобулинов. В результате измерения (Рисунок 19) были получены следующие значения констант диссоциаций (K_D), представленные в Таблице 18.

Таблица 18 – полученные значения констант диссоциации, измеренные между антителом В11-Fc и разными классами Fc рецепторов

Fc рецептор	CD16a	CD16b	CD32a	CD32b	FcRn	γ RI
K_D	$2,3 \cdot 10^{-8} M$	$4,2 \cdot 10^{-9} M$	$4,6 \cdot 10^{-8} M$	$4,5 \cdot 10^{-8} M$	$3,4 \cdot 10^{-8} M$	$2,6 \cdot 10^{-8} M$

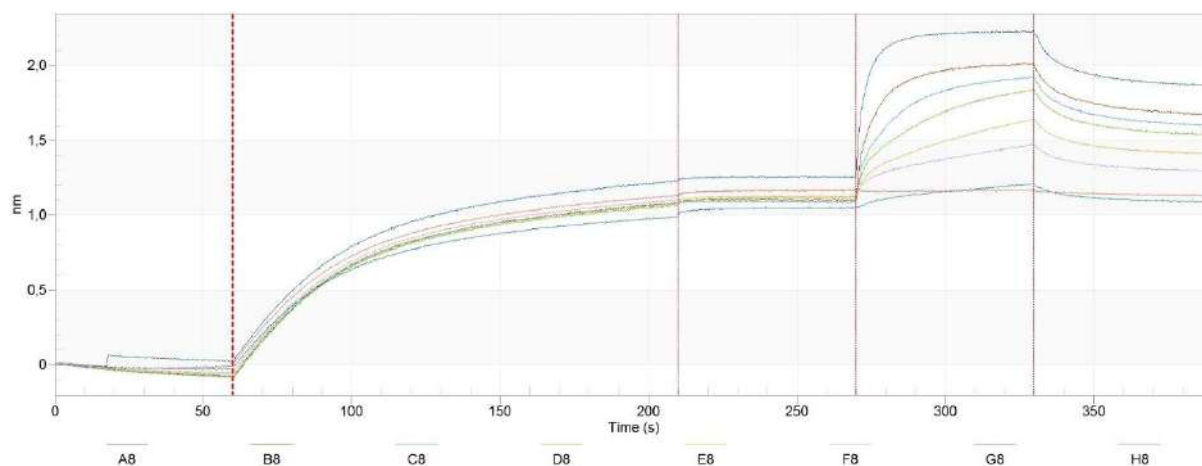


Рисунок 19 – Кривые биослойной интерферометрии взаимодействия антитела В11-Fc и γ RI.

В результате, было показано, что антитело В11-Fc взаимодействует с высокой аффинностью с различными классами человеческих Fc-рецепторов: FcRn, CD16a, CD16b, CD32a, CD32b, γ RI.

3.2.3 Изучение Fc-зависимой активации комплемента антителом В11-Fc

Изучение активации комплемента антителом В11-Fc проводили в реакции непрямого ИФА, подтверждая способность антитела взаимодействовать Fc-фрагментом с белком системы комплемента C1q. В результате было показано, что антитело В11-Fc в концентрациях 40-1000 мкг/мл взаимодействует с белком C1q (Рисунок 20).

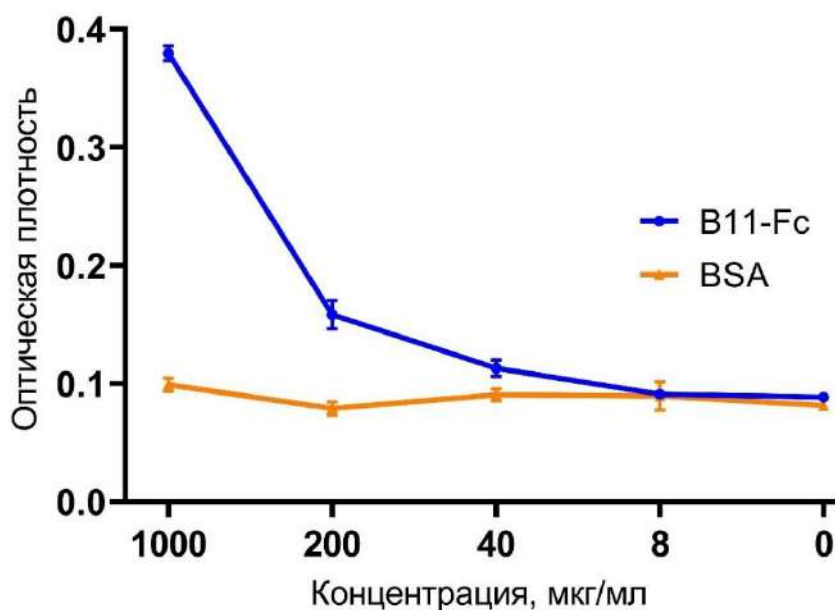


Рисунок 20 – Результат измерения оптической плотности взаимодействия антитела B11-Fc и белка системы комплемента C1q.

Таким образом, было продемонстрировано, что антитело B11-Fc способно взаимодействовать с белком системы комплемента C1q и, таким образом, предположительно, способно запускать каскад реакций активации системы комплемента в организме.

3.3 Доклинические исследования эффективности кандидатного препарата на основе модифицированного однодоменного антитела B11-Fc

3.3.1 Острая внутрибрюшинная модель интоксикации мышей VoNT/A

Внутрибрюшинная модель интоксикации VoNT/A считается стандартным методом в токсикологических исследованиях из-за высокой чувствительности организма к такому методу доставки [177]. В большинстве случаев для подобного рода исследований используются дозы 5-10 LD₅₀ VoNT/A. Поэтому для дальнейшего изучения антитела B11-Fc использовали данную мышиную модель с дозами VoNT/A 5 LD₅₀ или 10 LD₅₀. Развитие симптомов умеренной тяжести (абдоминальное и агональное дыхание, спазм диафрагмы и прилегающих мышц живота, оцененные по степени тяжести на 5 баллов из 10 возможных) и смертность

при использовании данных доз достигались спустя 3 и 8 часов соответственно для дозы 5 LD₅₀ и спустя 3 и 7 часов – для дозы 10 LD₅₀ (Рисунок 21).

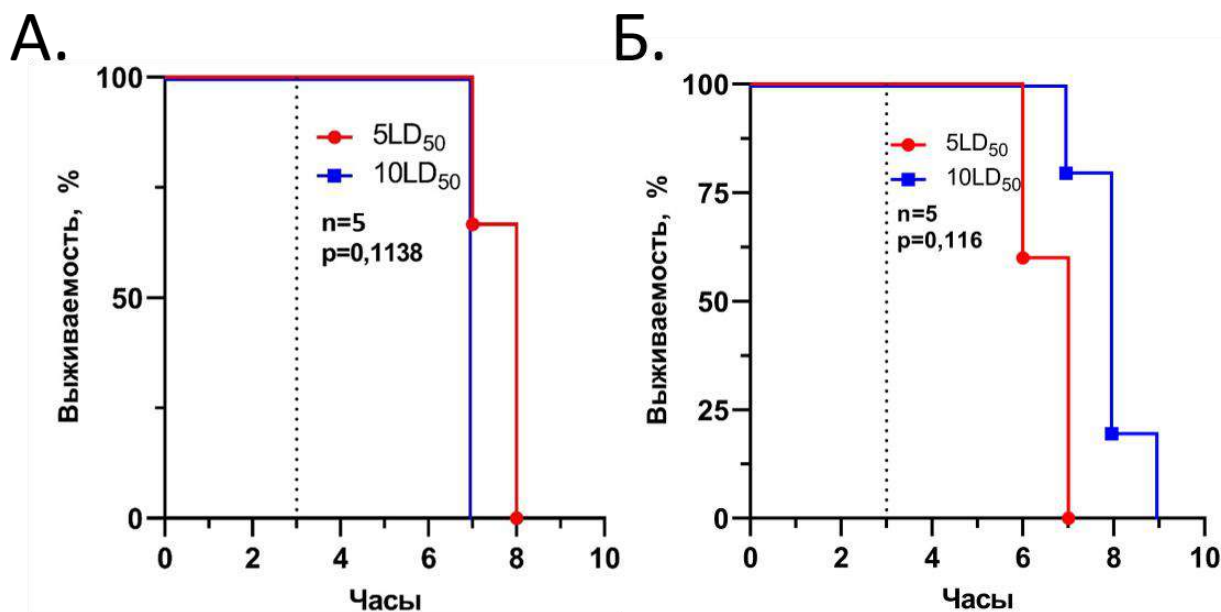


Рисунок 21 – Оценка времени развития симптомов и летальности при внутрибрюшинной интоксикации BoNT/A в дозах 5 LD₅₀ и 10 LD₅₀ различными препаратами BoNT/A. А и Б – две различные партии препарата BoNT/A. Пунктирной линией показано среднее время наступления симптомов ботулизма умеренной тяжести.

Таким образом, были получены данные по эффективности и воспроизводимости использования внутрибрюшинной интоксикации мышей BoNT/A в дозах 5 LD₅₀ и 10 LD₅₀ для оценки эффективности антитела В11-Fc.

3.3.2 Внутрижелудочная модель интоксикации мышей BoNT/A

Имеющиеся данные о внутривенном, внутрибрюшинном и внутримышечном способах введения BoNT/A указывают на то, что токсические проявления этих трех способов введения очень схожи [177]. Однако, поскольку наиболее частой формой ботулизма являются пищевые отравления, внутрижелудочный путь введения больше приближен к естественной форме интоксикации. Имеются данные [177],

что значение LD_{50} при внутрижелудочном введении от тысячи до миллиона раз больше, чем при внутрибрюшинном введении, что указывает на сниженную активность токсина при таком способе попадания в организм. Также симптомы ботулизма у человека возникают в течение 12-36 часов после внутрижелудочного воздействия токсина, а смерть наступает в течение 3 дней [32, 173, 42]. Поэтому, для увеличения длительности развития симптомов заболевания у мышей использовали внутрижелудочную модель интоксикации BoNT/A.

Для подбора эффективной дозы BoNT/A использовали 3000, 6000, 12000 и 18000 LD_{50} , которые вводили мышам внутрижелудочно. В результате было показано, что отсрочка развития симптомов интоксикации и смертности была увеличена в сравнении с внутрибрюшинной моделью: при использовании доз 12000 LD_{50} и 18000 LD_{50} BoNT/A летальность составляла 10 и 24 часа соответственно (Рисунок 22). Использование более низких доз приводило к отсутствию летального эффекта, а более высоких – ко слишком быстрому наступлению летальности опытных мышей.

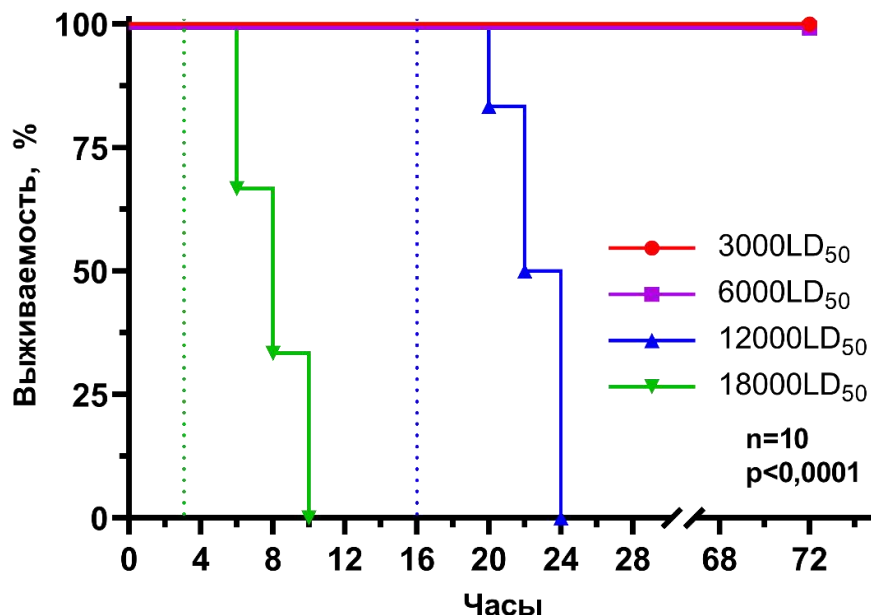


Рисунок 22 – Подбор оптимальной дозы BoNT/A для модели внутрижелудочной интоксикации мышей. Пунктирной линией показано время наступления симптомов ботулизма умеренной тяжести.

Таким образом, была подобрана оптимальная доза ВоNT/A для модели внутрижелудочной интоксикации мышей, которая позволяет увеличить длительность развития симптомов и летальности для изучения эффективности нейтрализации ВоNT/A антителом В11-Fc в приближенных к естественным условиям развития ботулизма.

3.3.3 Подбор протективной дозы антитела В11-Fc на острой модели интоксикации 10 LD₅₀ ВоNT/A

При внутрибрюшинной интоксикации групп из 5 мышей 10 LD₅₀ ВоNT/A и последующего внутривенного введения антитела В11-Fc в различных дозах была показана полная защита мышей в концентрациях 1,2 и 0,6 мг/кг (Рисунок 23). Дозы 0,3 и 0,06 мг/кг показали 80 и 40% соответственно. Доза 0,03 мг/кг не обладала значимой протективностью.

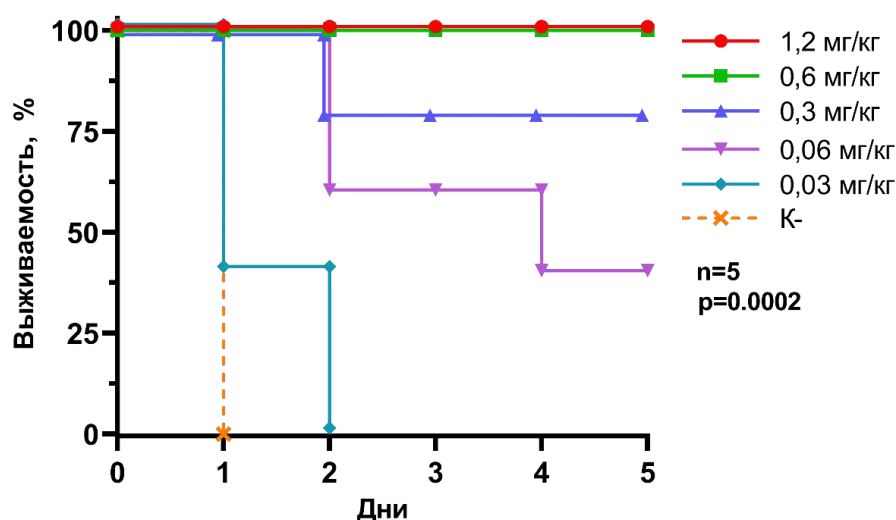


Рисунок 23 – Выживаемость групп мышей, получивших 10 LD₅₀ ВоNT/A одновременно с введением различных доз антитела В11-Fc.

Таким образом, были определены дозы антитела В11-Fc, обеспечивающие защиту мышей от интоксикации 10 LD₅₀ ВоNT/A. Доза антитела 0,6 мг/кг была выбрана для дальнейшего исследования как минимальная доза, обеспечивающая 100% защиту от летальной интоксикации мышей.

3.3.4 Оценка защитного потенциала протективной дозы антитела В11-Fc на острой модели интоксикации ВоNT/A

При внутрибрюшинной интоксикации групп из 5 мышей различными дозами ВоNT/A (5, 10, 20, 50 и 100 LD₅₀) и введения антитела В11-Fc в дозе 0,6 мг/кг была показана полная защита мышей против доз 5, 10 и 20 LD₅₀ ВоNT/A, 60% защита от дозы 50 LD₅₀ и 30% защита от дозы 100 LD₅₀ ВоNT/A (Рисунок 24).

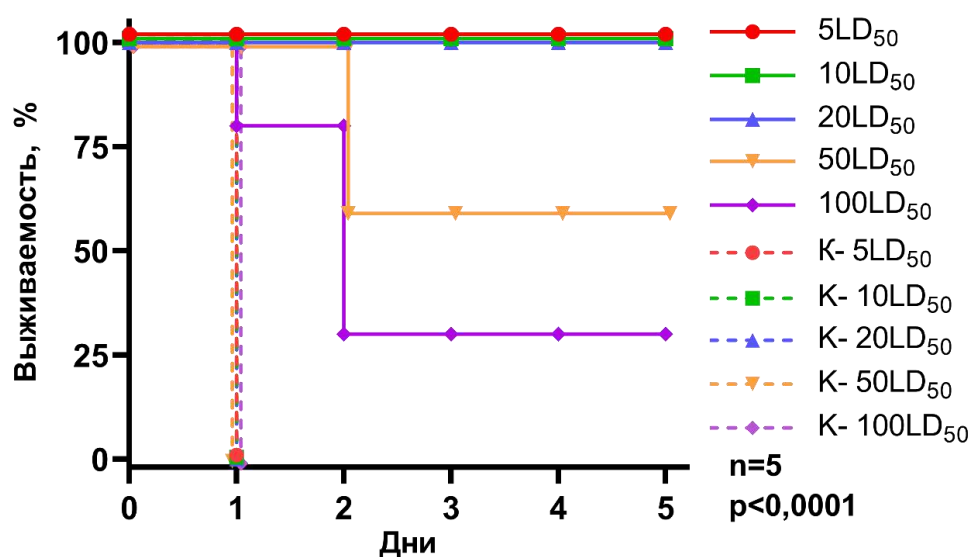


Рисунок 24 – Выживаемость групп мышей, получивших внутрибрюшинно различные LD₅₀ ВоNT/A одновременно с введением антитела В11-Fc в протективной дозе.

Таким образом, была продемонстрирована полная защита мышей при внутрибрюшинной интоксикации дозой не более 20 LD₅₀ ВоNT/A, что говорит о высоком защитном потенциале антитела В11-Fc.

3.3.5 Изучение фармакокинетики В11-Fc и защиты от внутрибрюшинной интоксикации ВоNT/A в различных режимах применения антитела *in vivo*

Группе, состоящей из 3 мышей BALB/c проводили внутривенное введение антитела В11-Fc в рабочей дозе 0,6 мг/кг. Спустя различные интервалы времени в

сыворотке мышей оценивали концентрацию антитела В11-Fc. В результате были получены данные динамики изменения концентрации В11-Fc в сыворотке крови с течением времени (Рисунок 25).

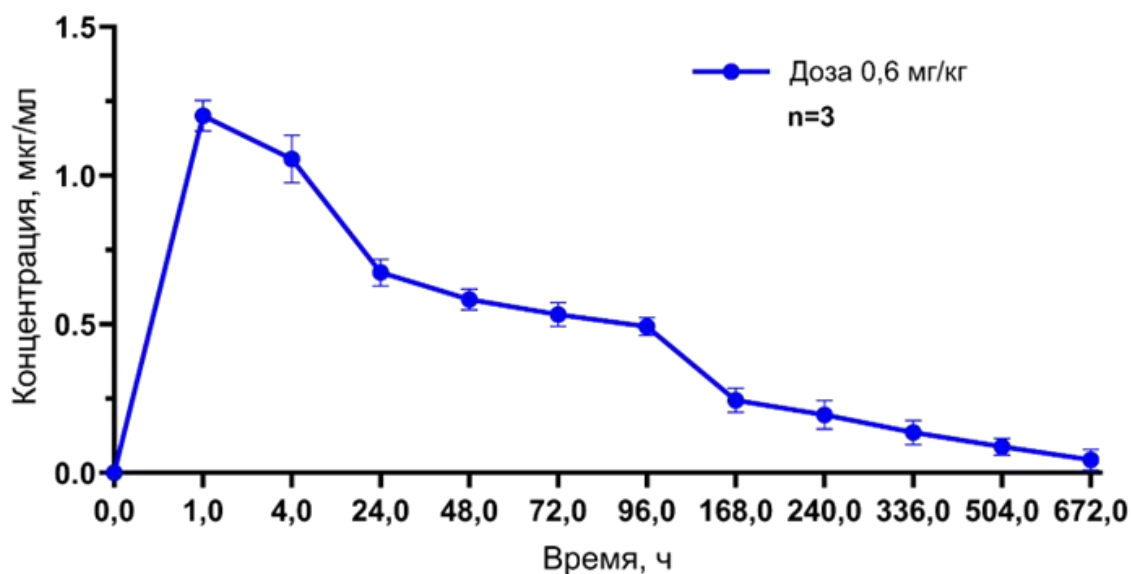


Рисунок 25 – Динамика изменения концентрации В11-Fc в сыворотке крови мышши.

Кроме того, были рассчитаны фармакокинетические параметры (Таблица 19); C_{max} – максимальная концентрация вещества в плазме крови; T_{max} – время достижения максимальной концентрации (C_{max}) лекарственного вещества в плазме крови; $AUC(0-t)$ - площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время» от момента введения препарата до 672 часов после введения.

Таблица 19 – Усредненные фармакокинетические параметры

Показатель	Ед.изм.	0,6 мг/кг
$T_{1/2}$	ч	46,4
T_{max}	ч	1,0
C_{max}	мкг/мл	1,22
$AUC(0-t)$	мкг/мл*ч	784,55

Таким образом была продемонстрирована длительная циркуляция антитела В11-Fc в сыворотки крови мыши, вследствие чего предполагается длительная защита от интоксикации ВоNT/A.

Для оценки возможности длительной защиты мышам в 5 группах, состоящих из 5 мышей, проводили внутривенное введение антитела В11-Fc в рабочей дозе. Спустя 7, 14, 21 и 28 дней им вводили 5 LD₅₀ ВоNT/A внутривенно. В результате была продемонстрирована полная защита мышей, получивших токсин спустя 7, 14 и 21 день, и отсутствие защиты мышей, получивших токсин на 28 сутки (Рисунок 26).

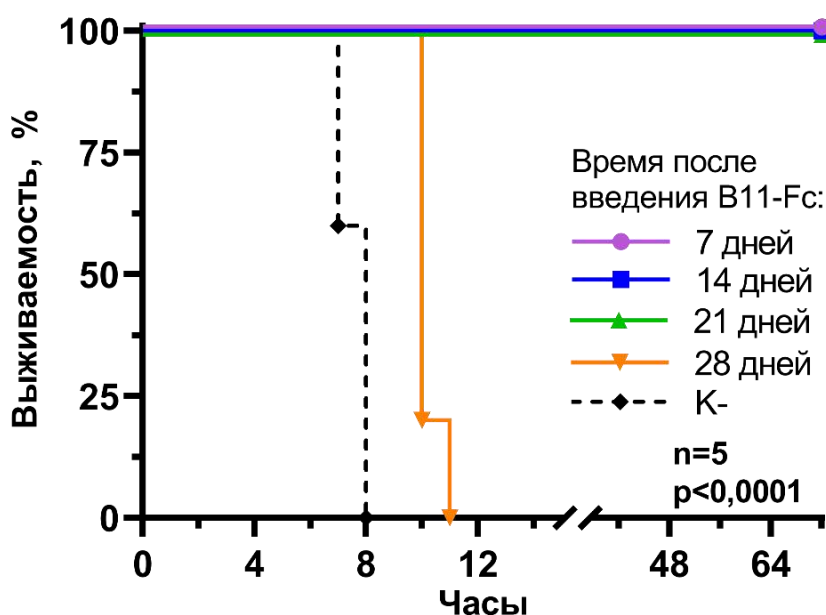


Рисунок 26 – Выживаемость групп мышей, которым вводили антитело В11-Fc и затем 5 LD₅₀ ВоNT/A внутривенно в различные интервалы времени в режиме длительной профилактики.

Другим 5 группам, состоящих из 10 мышей, проводили внутривенное введение 5 LD₅₀ ВоNT/A и внутривенное введение антитела В11-Fc спустя 0 (одновременно), 2, 4 и 6 часов. В результате была показана полная защита при одновременном введении В11-Fc и с отсрочкой в 2 часа, 40% защита – с отсрочкой в 4 часа и отсутствие защиты при введении В11-Fc с отсрочкой в 6 часов (Рисунок 27).

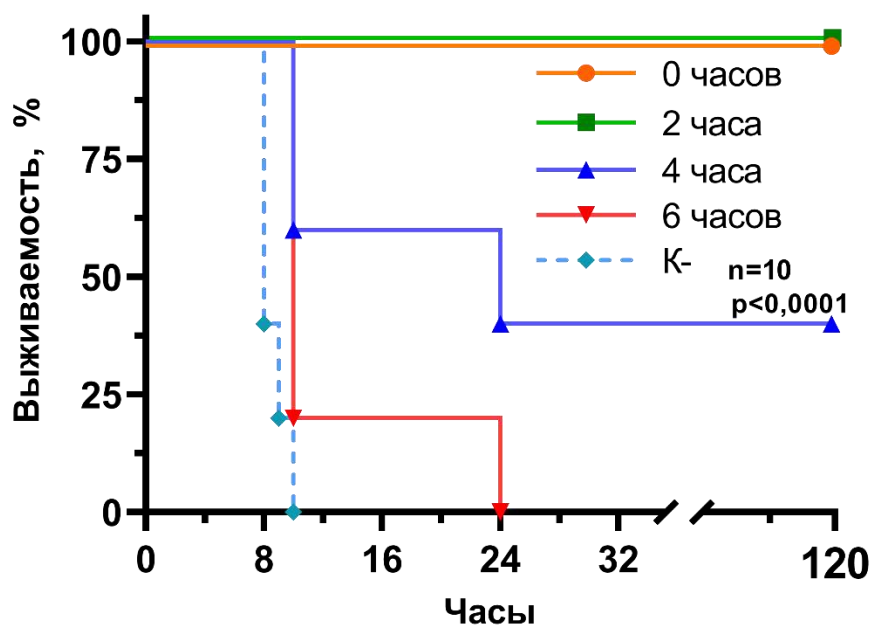


Рисунок 27 – Выживаемость групп мышей, которым вводили 5 LD₅₀ BoNT/A внутрибрюшинно, и затем антитело B11-Fc в различные интервалы времени в режимах экстренной профилактики и терапии.

Таким образом показана полная защита мышей в профилактическом режиме применения антитела B11-Fc при внутрибрюшинной интоксикации 5 LD₅₀ BoNT/A не позднее 21 суток после введения антитела. Также показана 100% защита мышей при введении антитела B11-Fc одновременно с интоксикацией. Защита наблюдалась при введении B11-Fc не позднее 2 часов после интоксикации 5 LD₅₀ BoNT/A, т.е. в экстренно-профилактическом режиме. При введении антител в режиме терапии (до 6 часов после интоксикации) наблюдалась частичная защита.

3.3.6 Изучение возможности терапии антителом B11-Fc при внутрижелудочной интоксикации мышей BoNT/A *in vivo*

При внутрижелудочном введении BoNT/A в дозе 12000 LD₅₀ умеренные симптомы ботулизма в виде абдоминального дыхания и ярко выраженного спазма мышц диафрагмы и живота развивались спустя 14 часов после интоксикации, после чего происходила гибель мышей спустя 24 часа после интоксикации без

применения терапии. Введение антитела В11-Fc в различные интервалы времени после появления симптомов ботулизма позволило предотвратить дальнейшее развитие клинической картины у некоторых групп, состоящих из 10 мышей: группы, получившие антитело В11-Fc в дозе 0,6 мг/кг спустя 12 и 14 часов после внутрижелудочной интоксикации дозой 12000 LD₅₀, показали 100% выживаемость в течение 72 часов после интоксикации; группы, получившие антитело спустя 16 и 18 часов показали выживаемость 60 и 50% соответственно; группа, получившая антитело спустя 20 часов показала 0% выживаемость спустя 48 часов после интоксикации (т.е. введение антитела В11-Fc увеличило продолжительность жизни группы животных в сравнении с контрольной группой) (Рисунок 28).

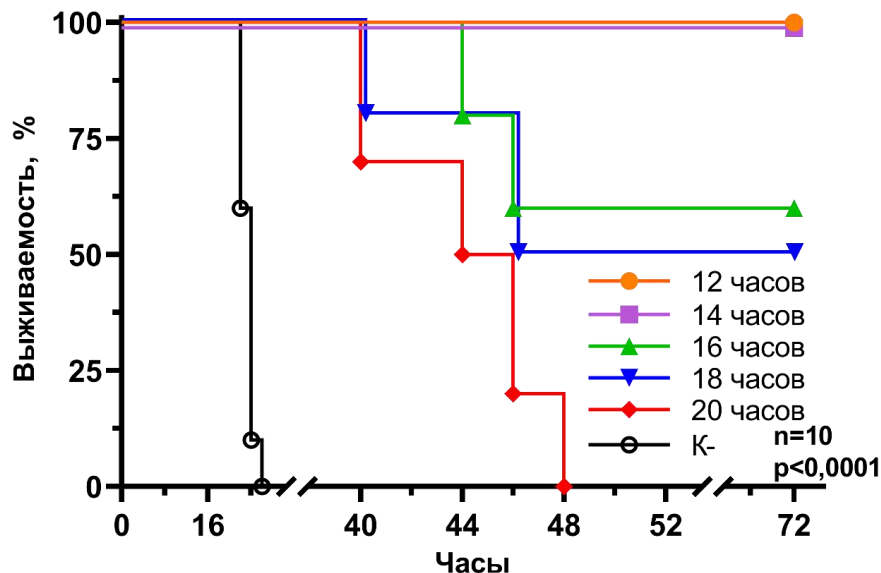


Рисунок 28 – Выживаемость групп мышей, получивших антитело В11-Fc в различные интервалы времени после внутрижелудочного введения 12000 LD₅₀ ВоNT/A.

Использование противоботулинической лошадиной сыворотки вместо антитела В11-Fc в аналогичном режиме введения показало корреляцию с защитой В11-Fc: введение противоботулинической сыворотки спустя 12 и 14 часов после внутрижелудочной интоксикации 12000 LD₅₀ ВоNT/A продемонстрировало 100% выживаемость; группы, получившие антитело спустя 16 и 18 часов показали

выживаемость 50%; группа, получившая антитело спустя 20 часов показала 0% выживаемость спустя 48 часов после интоксикации (Рисунок 29).

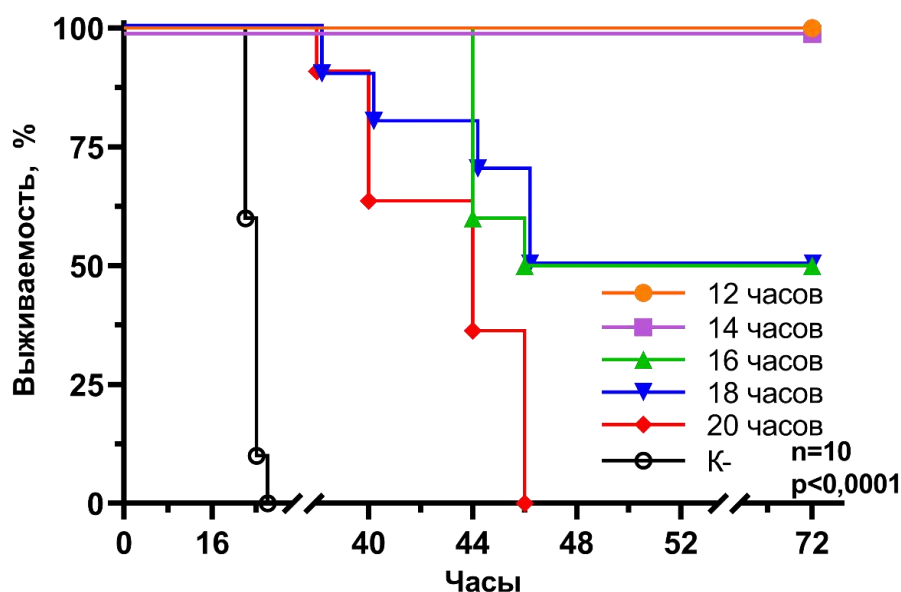


Рисунок 29 – Выживаемость групп мышей, получивших противоботулиническую сыворотку лошади в различные интервалы времени после внутрижелудочного введения 12000 LD₅₀ BoNT/A.

Таким образом была показана возможность применения антитела B11-Fc для терапии внутрижелудочной интоксикации мышей BoNT/A в дозе 12000 LD₅₀ при введении антитела B11-Fc до появления симптомов ботулизма умеренной степени тяжести, проявляющихся в виде ярко выраженного спазма диафрагмы и прилежащих мышц живота совместно с абдоминальным дыханием.

3.4 Доклинические исследования безопасности кандидатного препарата на основе модифицированного однодоменного антитела B11-Fc¹

3.4.1 Изучение фармакокинетики B11-Fc

Полученные результаты определения концентрации B11-Fc в сыворотке крови использовали для построения кривой изменения концентрации во времени

¹ Некоторые из данных, описываемых в разделе, представлены в виде текстового описания полученных результатов ввиду большого количества изучаемых параметров.

для каждой из групп животных. На Рисунке 30 представлены экспериментальные данные по определению концентрации В11-Fc в образцах крови после однократного внутривенного введения различных доз препарата. После однократного введения препарат В11-Fc детектировали в сыворотке, начиная с первой временной точки, время достижения максимальной концентрации составило 0,5 ч. Стах составило 37, 125,5 и 232 мкг/мл для доз 6, 30 и 60 мг/кг соответственно. В Таблице 20 представлены фармакокинетические параметры для препарата В11-Fc.

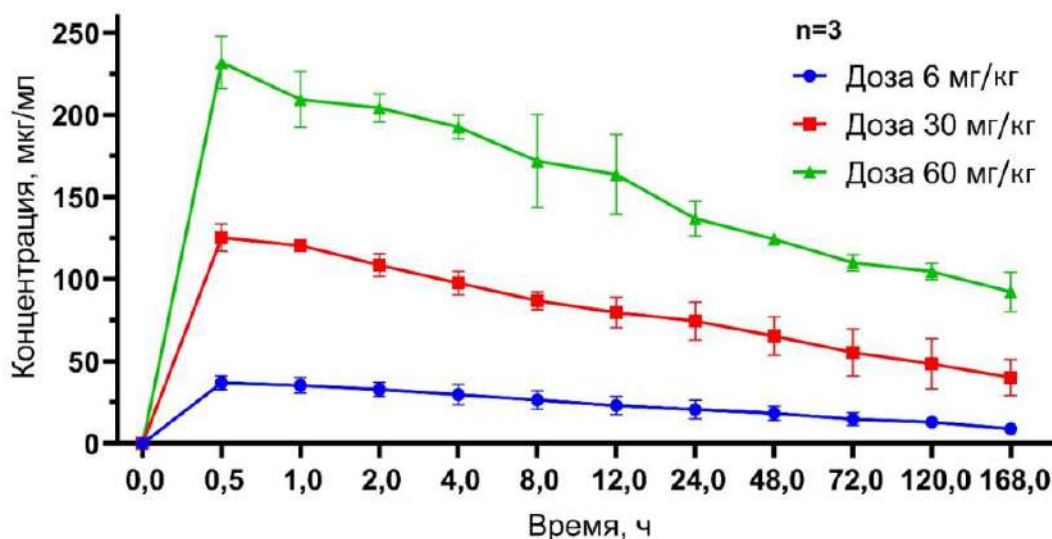


Рисунок 30 – Динамика изменения концентрации В11-Fc в сыворотке крови.

Ниже приведено подробное описание расчетных фармакокинетических параметров:

Стах – максимальная концентрация вещества в плазме крови за период наблюдения; Ттах – время достижения максимальной концентрации (Стах) лекарственного вещества в плазме крови; $AUC(0-t)$ - площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время» от момента введения препарата до 168 часов после введения; $AUC0-X$ - площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время» от момента введения до бесконечности; $AUMC 0-X$ – площадь под кривой первого момента; Cl - общий

клиренс – параметр, отражающий объем тест-ткани, который освобождается от лекарственного вещества в единицу времени и определяется отношением дозы лекарственного вещества к AUC_{0-t} ; MRT - среднее время пребывания в организме молекулы лекарственного вещества; рассчитывается как отношение $AUMC(0-t)$ к $AUC(0-t)$; $T_{1/2}$ - период полувыведения лекарственного вещества; определяется по формуле: $T_{1/2} = \ln(2) / K_{el}$; V_z - видимый объем распределения после введения рассчитывался для конечного участка как Доза / $\lambda_z \times AUC$.

Таблица 20 – Усредненные фармакокинетические параметры препарата В11-Fc

Показатель	Ед.изм.	6 мг/кг	30 мг/кг	60 мг/кг
$T_{1/2}$	ч	122,21746	209,795114	270,4704366
T_{max}	ч	0,5	0,5	0,5
C_{max}	мкг/мл	37,0	125,5	232,0
$AUC(0-t)$	мкг/мл*ч	2687,8	9840,2	19880,8
$AUC(0-X)$	мкг/мл*ч	4286,4	22058,0	55961,9
$AUMC(0-t)$	мкг/мл*ч ²	735198,2	6456639,9	21628932,9
MRT	ч	171,5	292,7	386,5
V_z	мл/(мкг/мл)	0,25	0,08	0,04
Cl	мл/(мкг/мл)/ч	0,00	0,00	0,00

Для проверки гипотезы линейности был проведен регрессионный анализ, в результате которого было установлено, что уравнение линейной регрессии является значимым ($P < 0,05$), свободный член уравнения незначимо отличается от нуля: абсолютное значение критерия t составило 0,9907 и 0,9971 для AUC и C_{max} (Рисунок 31). Полученные результаты позволяют принять гипотезу линейности для изучаемых доз препарата В11-Fc.

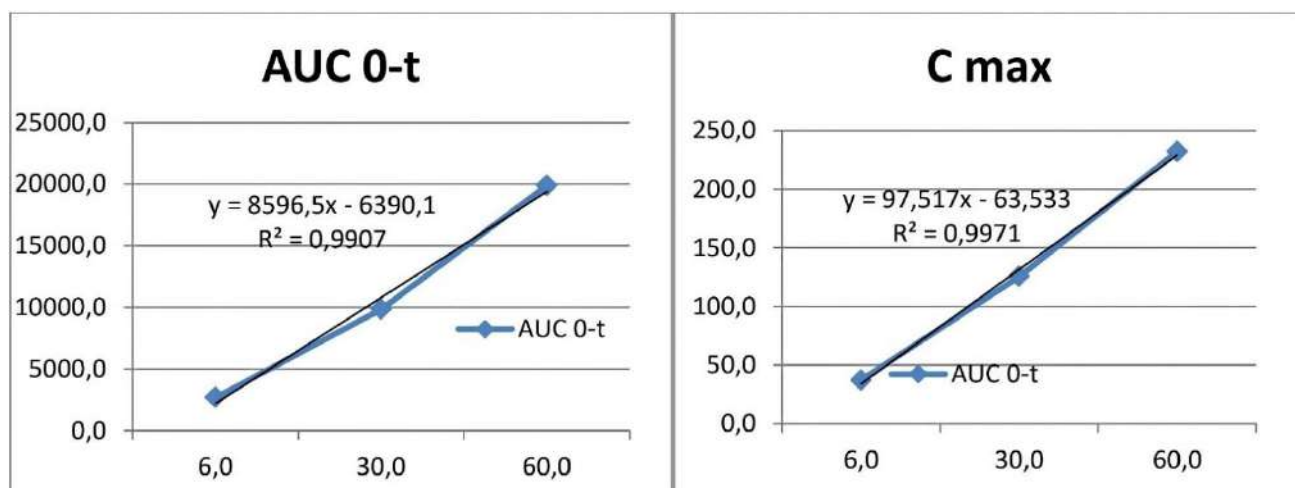


Рисунок 31 – Проверка линейности для изучаемых доз препарата В11-Fc.

Таким образом было проведено исследование фармакокинетики препарата В11-Fc при внутривенном введении на кроликах Шиншилла и были рассчитаны его фармакокинетические параметры. Также была подтверждена гипотеза линейности для изучаемых доз.

3.4.2 Исследование острой токсичности и местного раздражающего действия препарата В11-Fc

В результате введения препарата В11-Fc и контрольного раствора мышам и крысам в дозах, превышающих суточную терапевтическую дозу для человека в среднем в 420 и 168 раз соответственно, не было выявлено отличий между опытными и контрольными группами в их внешнем виде, зоосоциальном поведении, реакциями на внешние раздражители, поедании корма, частоты мочеиспускания, мышечном тонусе и др. Сразу после введения препаратов животные были немного заторможены. Динамика изменения массы животных приведена на Рисунке 32. Анализ полученных данных показывает, что масса тела всех опытных животных на протяжении эксперимента значимо не отличалась от контрольных значений.

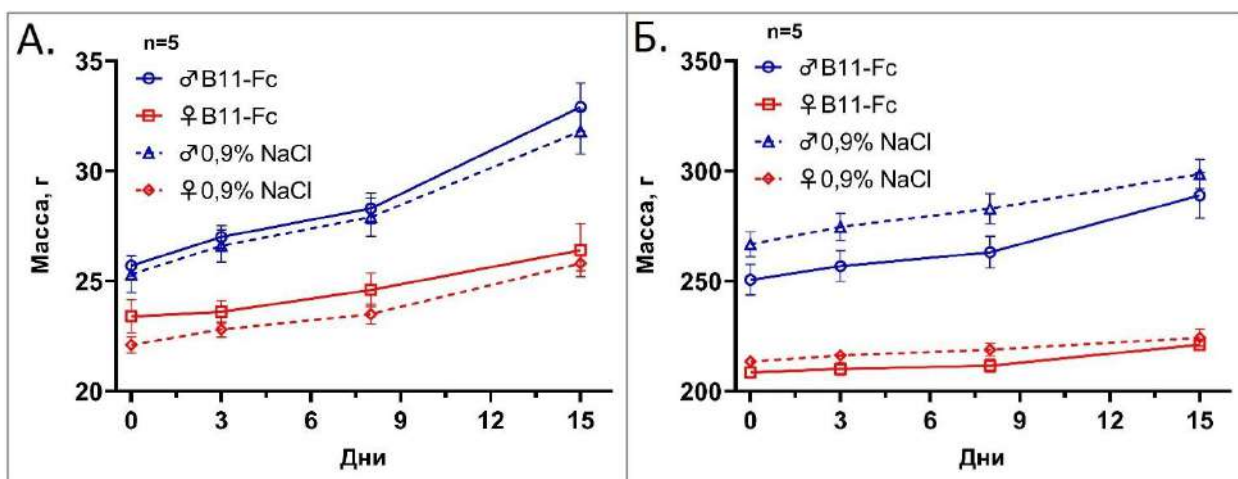


Рисунок 32 – Динамика изменения массы мышей (А) и крыс (Б) в опытных и контрольных группах.

Животных подвергали эвтаназии на 15 сутки. После установления факта смерти проводили necropsy с извлечением органов. При макроскопическом исследовании отчетливого влияния тестируемого препарата на состояние внутренних органов мышей и крыс не установлено, различий между контрольными и опытными группами не обнаружено. При изучении относительной массы внутренних органов, у мышей самцов было установлено достоверное увеличение массы тимуса (Рисунок 33). У самок крыс было выявлено увеличение массы печени. Других отклонений выявлено не было.

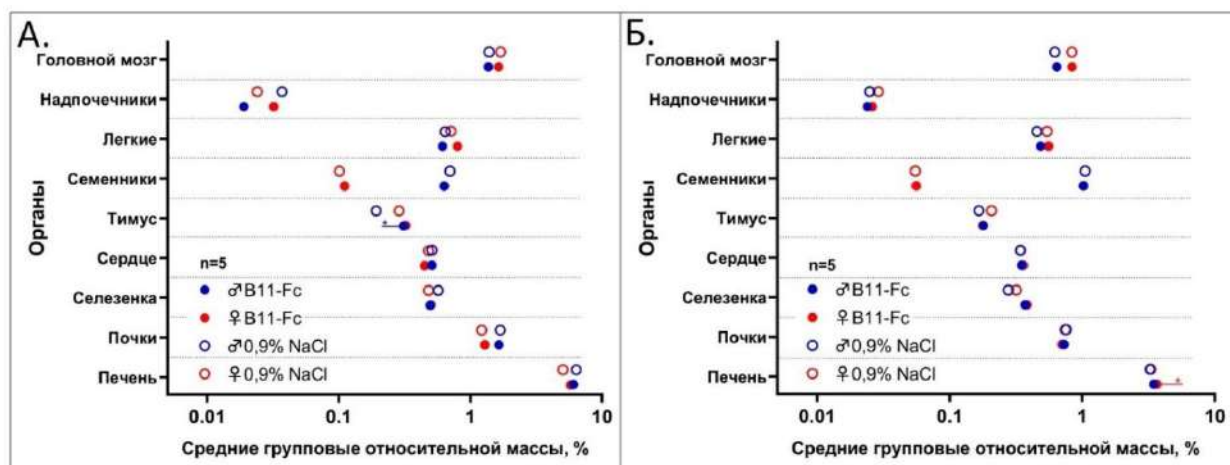


Рисунок 33 – Средние групповые показатели относительной массы внутренних органов мышей (А) и крыс (Б), выраженные в %. Символ «*» означает значимое различие в сравнении с контролем по t критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

При оценке местнораздражающего действия визуально не регистрировали отклонения на протяжении всего исследования. Хвосты у животных были обычной формы и размеров. Образования тромбофлебитов и тромбозов не наблюдали.

Таким образом проведенное экспериментальное исследование показало, что препарат в условиях двукратного внутривенного введения высоких доз не оказал значимого токсического действия на организм лабораторных животных. Наличие у исследуемого препарата местнораздражающего действия, в рамках проведенного эксперимента, не установлено.

3.4.3 Исследование токсичности и местной токсичности при многократном введении препарата В11-Fc крысам

Ежедневный осмотр животных показал, что многократное внутривенное введение препарата В11-Fc в дозах 7,5 мг/кг, 15 мг/кг и 30 мг/кг не вызывает изменений в общем состоянии и поведении животных. В ходе эксперимента не было отмечено изменений со стороны вегетативных реакций. Препарат не влияет на состояние шерстного покрова, не вызывает изменений глаз, не влияет на состояние слизистых носа и ротовой полости. На протяжении всего эксперимента не наблюдалось влияния исследуемого препарата на аппетит и характер стула

экспериментальных животных. Ежедневный клинический осмотр лабораторных животных не выявил влияния исследуемого препарата на характер дыхания, не отмечено изменений в двигательной активности и контактности животных.

Статистический анализ данных, полученных при взвешивании, установил, что масса тела самцов и самок крыс на протяжении эксперимента статистически значимо не отличалась между опытными и контрольной группами ($p > 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса) (Рисунок 34).

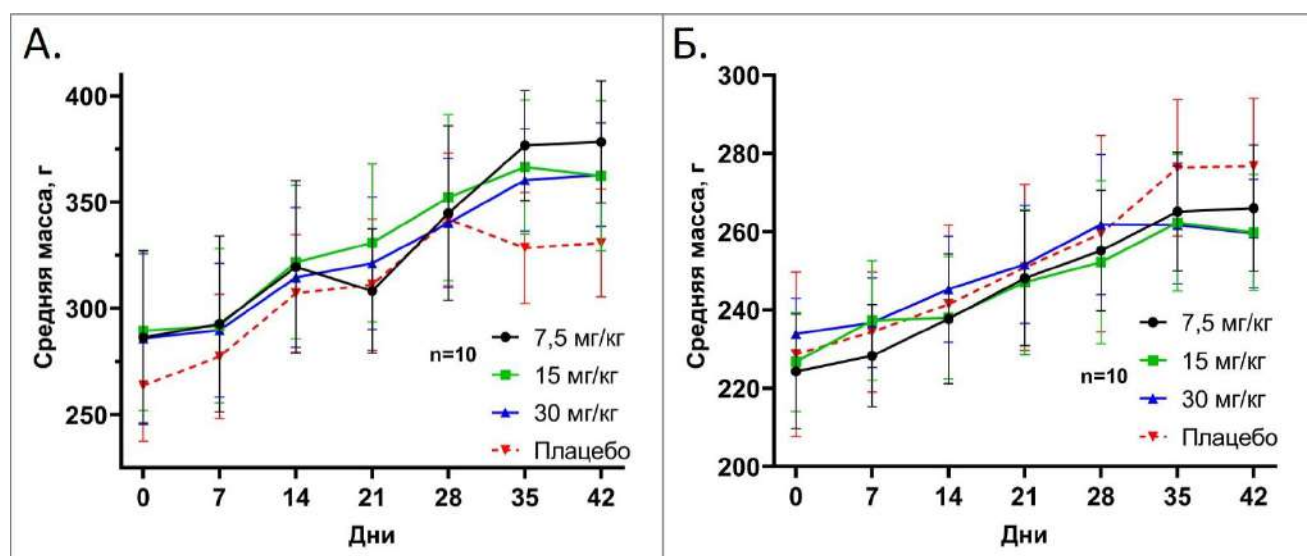


Рисунок 34 – Динамика изменения средних значений массы самцов (А) и самок (Б) при различных вводимых дозах препарата В11-Fc.

Подсчет клеточности на 29 сутки выявил:

Сравнение групп самцов с помощью критерия Краскела-Уоллиса выявило статистически значимое различие между этими группами по количеству плазматических клеток ($p < 0,05$) (Рисунок 35), однако попарное сравнение с контрольной группой не выявило различий между экспериментальными и контрольной группой, что говорит об отсутствии влияния препарата.

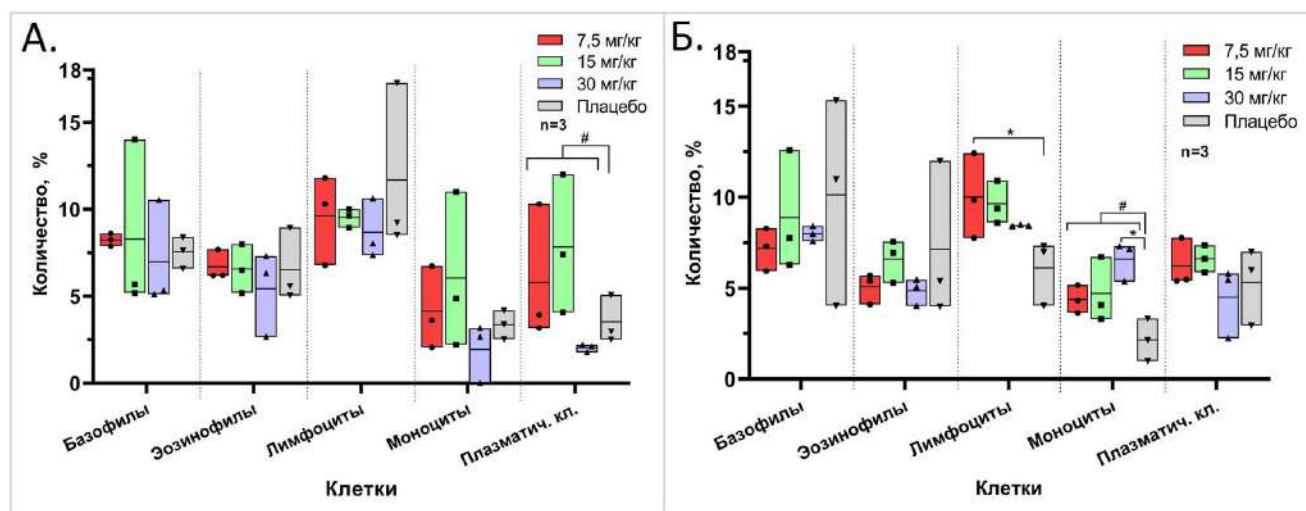


Рисунок 35 – Сравнение значений миелограммы некоторых иммунных клеток самцов, имеющих достоверное различие, на 29 (А) и 43 (Б) сутки. Символ «#» обозначает статистически значимую разницу по сравнению с группами плацебо (критерий Краскела-Уоллиса, $p < 0,05$). Символ «*» обозначает статистически значимую разницу по сравнению с группами плацебо (критерий Даннета, $p < 0,05$).

При анализе показателей клеточности у самок на 29 сутки не было выявлено статистически значимых различий между группами.

Подсчет клеточности на 43 сутки выявило:

Сравнение групп с помощью критерия Краскела-Уоллиса выявило статистически значимое различие между группами самцов по количеству моноцитов ($p < 0,05$). В группе, получавшей дозу 7,5 мг/кг, было выявлено статистически значимое увеличение процента лимфоцитов по сравнению с контрольной группой; в группе, получавшей дозу 30 мг/кг – увеличение процента моноцитов по сравнению с контрольной группой (критерий Даннета, $p < 0,05$). Указанные изменения не носили дозозависимый характер, что говорит об отсутствии влияния препарата.

При анализе показателей клеточности у самок на 43 сутки не было выявлено статистически значимых различий между группами.

Статистический анализ показателей мочи, сердечно-сосудистой системы и ЦНС не выявил достоверных различий между контрольными и опытными группами.

Гематологические показатели

Гематологическое исследование на 29 сутки выявило:

Для самцов:

Сравнение групп с помощью критерий Краскела-Уоллиса выявило статистическое различие между группами по параметрам лейкоцитов, $p < 0,05$. В группе, получавшей дозу 15 мг/кг, было зафиксировано статистически значимое снижение числа лейкоцитов по сравнению с контрольной группой (критерий Даннета, $p < 0,05$) (Рисунок 36).

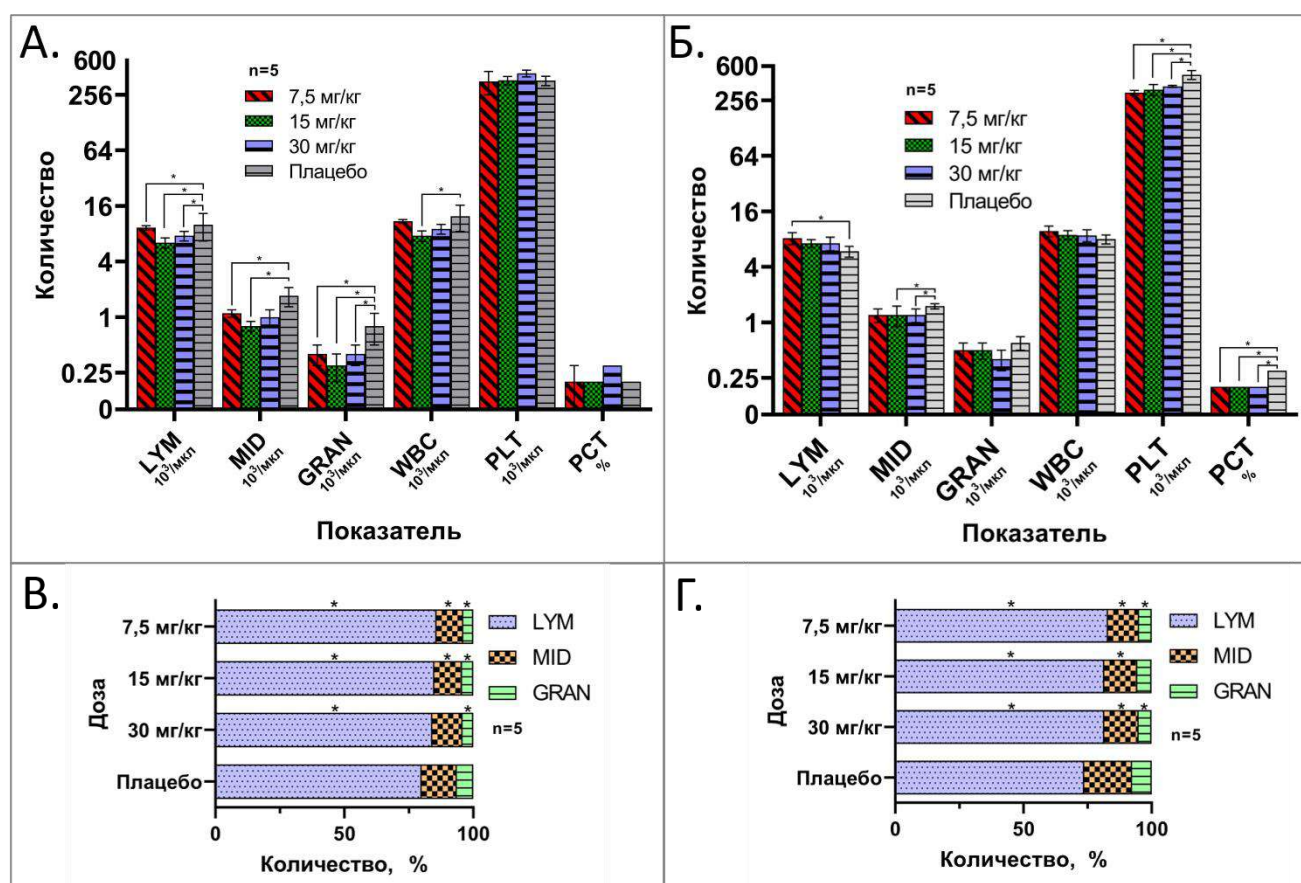


Рисунок 36 – Некоторые из гематологических показателей, имеющих статистически значимую разницу, у самцов крыс на 29 (А и В) и 43 (Б и Г) сутки после первого введения препарата В11-Fc. Символ «*» обозначает статистически значимую разницу по сравнению с группами плацебо (критерий Даннета, $p < 0,05$).

Расшифровка показателей: LYM – лимфоциты, MID – средние клетки, GRAN – гранулоциты, WBC – лейкоциты, PLT – тромбоциты, PCT – тромбокрит.

Во всех трех группах отмечали дозозависимый сдвиг лейкоцитарной формулы в сторону увеличения процента лимфоцитов, снижения процента средних клеток в группах, получавших дозы 7,5 мг/кг и 15 мг/кг, и снижения процента гранулоцитов во всех трех экспериментальных группах по сравнению с контрольной группой (критерий Даннета, $p < 0,05$). Отмеченные изменения, вероятно, связаны с фармакологической активностью препарата.

Для самок:

Сравнение групп с помощью критерий Краскела-Уоллиса выявило статистическое различие между группами по параметрам лейкоцитов и эритроцитов, $p < 0,05$. В группе, получавшей дозу 15 мг/кг, был зафиксирован сдвиг лейкоцитарной формулы в сторону увеличения процента гранулоцитов по сравнению с контрольной группой (критерий Даннета, $p < 0,05$) (Рисунок 37). Также было отмечено статистически достоверное снижение уровня гемоглобина, гематокрита и среднего объема тромбоцитов по сравнению с контрольной группой (критерий Даннета, $p < 0,05$). Отмеченные изменения не носили дозозависимый характер, что говорит об отсутствии влияния препарата.

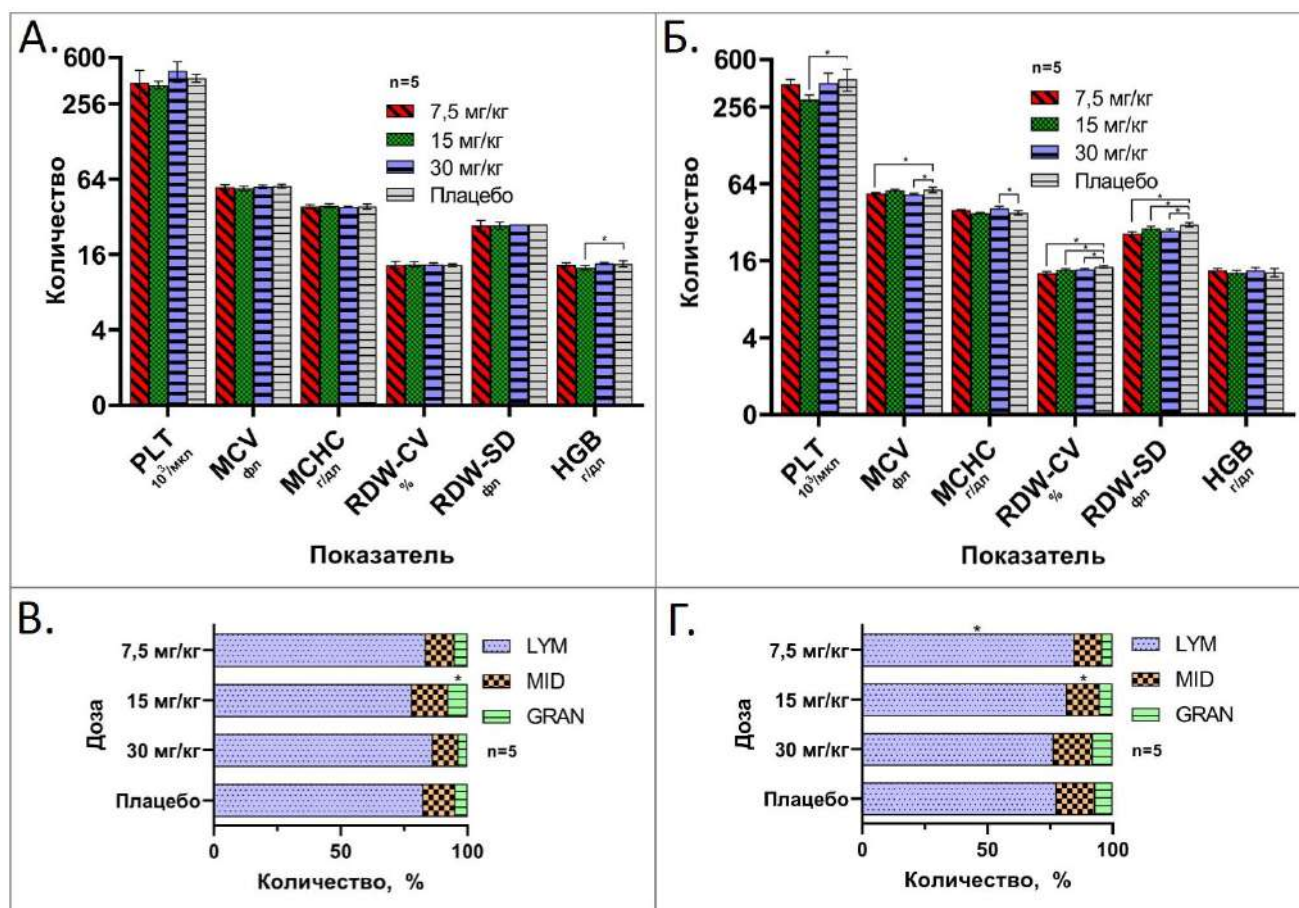


Рисунок 37 – Некоторые из гематологических показателей, имеющих статистически значимую разницу, у самок крыс на 29 (А и В) и 43 (Б и Г) сутки после первого введения препарата В11-Fc. Символ «*» обозначает статистически значимую разницу по сравнению с группами плацебо (критерий Даннета, $p < 0,05$). Расшифровка показателей: PLT – тромбоциты; MCV – средний объем эритроцитов; MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; RDW-CV – широта распределения популяции эритроцитов (коэффициент вариации); RDW-SD – широта распределения популяции эритроцитов (стандартное отклонение); HGB – концентрация гемоглобина; LYM – лимфоциты; MID – средние клетки; GRAN – гранулоциты.

Гематологическое исследование на 43 сутки выявило:

Для самцов:

Сравнение групп с помощью критерий Краскела-Уоллиса выявило статистическое различие между группами по параметрам белых клеток крови и

тромбоцитов, $p < 0,05$. Во всех трех экспериментальных группах было зафиксировано статистически значимое дозозависимое снижение процента средних клеток и увеличение процента лимфоцитов по сравнению с контрольной группой (критерий Даннета, $p < 0,05$) (Рисунок 37). В группах, получавших дозы 7,5 мг/кг и 30 мг/кг, было отмечено статистически значимое снижение процента гранулоцитов по сравнению с контрольной группой (критерий Даннета, $p < 0,05$).

Для самок:

Сравнение групп с помощью критерий Краскела-Уоллиса выявило статистическое различие между группами по параметрам белых клеток крови и эритроцитов, $p < 0,05$. В группах, получавших дозы 7,5 мг/кг и 30 мг/кг, было отмечено статистически значимое снижение процента гранулоцитов по сравнению с контрольной группой (критерий Даннета, $p < 0,05$). Также отмечали снижение среднего объема эритроцитов. В группе, получавшей дозу 15 мг/кг, было зафиксировано статистически значимое снижение числа тромбоцитов по сравнению с контрольной группой (критерий Даннета, $p < 0,05$). В группе, получавшей дозу 30 мг/кг, было выявлено статистически значимое снижение среднего объема эритроцитов и увеличение средней концентрации гемоглобина в эритроците по сравнению с контрольной группой (критерий Даннета, $p < 0,05$). Во всех экспериментальных группах отмечали статистически значимое снижение широты распределения популяции эритроцитов по сравнению с контрольной группой (критерий Даннета, $p < 0,05$).

Не упомянутые гематологические параметры крови экспериментальных животных статистически значимо не отличались от контрольной группы ($p > 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса и критерий Даннета).

Биохимические показатели

Анализ биохимических показателей на 29 сутки выявил следующее:

Для самцов:

Сравнение групп с помощью критерий Краскела-Уоллиса выявило статистическое различие между группами по уровню креатинина и глюкозы, $p < 0,05$. Во всех трех экспериментальных группах было зафиксировано статистически

значимое недозозависимое снижение уровня креатинина по сравнению с контролем (критерий Даннета, $p < 0,05$), однако индивидуальные значения находились в рамках физиологической нормы. Также в группах, получавших дозы 15 мг/кг и 30 мг/кг, было отмечено снижение уровня глюкозы по сравнению с контролем.

Для самок:

Сравнение групп с помощью критерий Краскела-Уоллиса выявило статистически различие между группами по уровню триглицеридов и общего белка, $p < 0,05$. Во всех трех экспериментальных группах было зафиксировано статистически значимое снижение уровня триглицеридов по сравнению с контролем (критерий Даннета, $p < 0,05$), однако индивидуальные значения находились в рамках физиологической нормы. Также в группе, получавшей дозу 7,5 мг/кг отмечали статистически значимое снижение уровня креатинина по сравнению с контролем (критерий Даннета, $p < 0,05$).

Анализ биохимических показателей на 29 сутки выявил следующее:

Для самцов:

Сравнение групп с помощью критерий Краскела-Уоллиса выявило статистически значимое различие между группами по уровню креатинина и глюкозы, $p < 0,05$. В группе, получавшей дозу 7,5 мг/кг, было отмечено статистически значимое повышение, а в группе, получавшей дозу 30 мг/кг – снижение уровня глюкозы по сравнению с контролем (критерий Даннета, $p < 0,05$), однако изменение не носило дозозависимый характер. Также в группе, получавшей дозу 15 мг/кг, отмечали повышение уровня креатинина по сравнению с контролем (критерий Даннета, $p < 0,05$), однако индивидуальные значения находились в рамках физиологической нормы. Описываемые результаты не представлены.

Для самок:

Сравнение групп с помощью критерий Краскела-Уоллиса выявило статистически различие между группами по уровню лактатдегидрогеназы (ЛДГ), мочевины и креатинина, $p < 0,05$. В группах, получавших дозу 7,5 мг/кг и 15 мг/кг, было отмечено статистически значимое недозозависимое снижение уровня

мочевины, в группе, получавшей дозу 15 мг/кг – повышение уровня глюкозы по сравнению с контрольной группой (критерий Даннета, $p < 0,05$), однако индивидуальные значения находились в рамках физиологической нормы.

Колебания остальных биохимических показателей оставались в рамках физиологической нормы, достоверных различий между опытными группами и контролем не обнаружено ($p > 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса). Описываемые результаты не представлены.

Прочие исследования

Анализ параметров гемостаза выявил в группе, получавшей дозу 30 мг/кг, статистически значимое увеличение АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время) по сравнению с контрольной группой (критерий Даннета, $p < 0,05$), однако изменение не носило дозозависимый характер, что говорит об отсутствии влияния препарата.

Некропсия, проведенная на 29 и 43 сутки эксперимента, не выявила отклонений в строении тела и структуре внутренних органов у крыс опытных групп в сравнении с контрольной группой.

При сравнительном анализе внутренних органов крыс групп, получавших дозы 7,5 мг/кг, 15 мг/кг и 30 мг/кг, не было выявлено патоморфологических изменений, а также признаков цитотоксического действия препарата спустя 29 и 43 сутки после введения.

Гистологическое строение изучаемых образцов соответствует норме – гистоархитектонике внутренних органов подгрупп на 29 и 43 сутки контрольной группы (плацебо) (Рисунок 38).

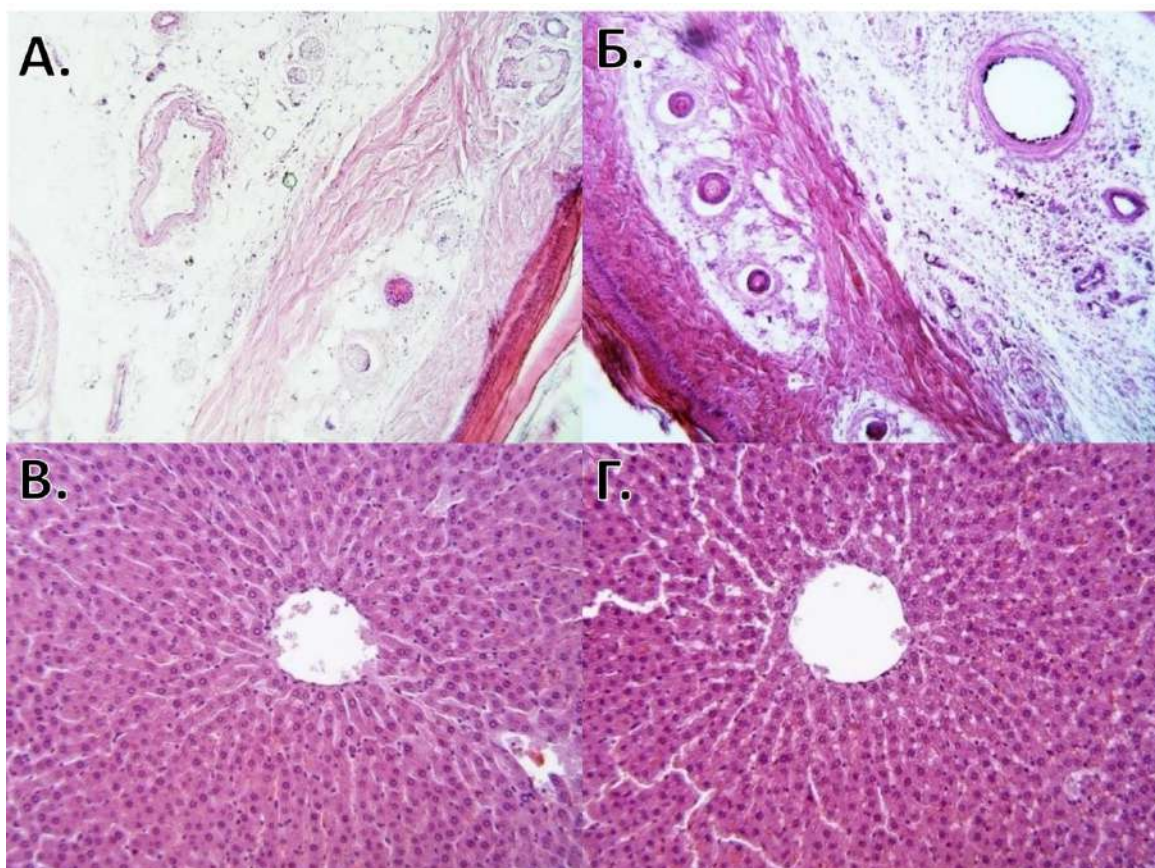


Рисунок 38 – Микрофотографии гистологического строения некоторых образцов тканей, взятых у группы плацебо (А и В) и группы самцов, получивших дозу 30 мг/кг (Б и Г), окрашенных гематоксилином и эозином. А, Б – место введения (хвостовая вена и прилегающие ткани), увеличение $\times 100$. В, Г – печень, увеличение $\times 200$.

Кроме того, было подтверждено отсутствие у исследуемого препарата местнораздражающего действия при многократном внутривенном введении в течение 28 дней.

Таким образом результаты исследования токсичности при многократном (в течение 28 суток) внутривенном применении у аутбредных крыс обоего пола в дозах 7,5 мг/кг, 15 мг/кг и 30 мг/кг свидетельствуют о безопасности препарата В11-Fc.

3.4.4 Исследование токсичности и местно-раздражающего действия при многократном введении препарата В11-Fc кроликам

Ежедневный клинический осмотр животных свидетельствует о том, что многократное внутривенное введение препарата В11-Fc в дозах 2,4 мг/кг, 12 мг/кг и 24 мг/кг не вызывает изменений в общем состоянии и поведении кроликов. В ходе эксперимента не было отмечено изменений со стороны вегетативных реакций.

Статистический анализ данных, полученных при взвешивании, установил, что масса тела самцов и самок кроликов на протяжении эксперимента статистически значимо не отличалась между опытными и контрольной группами ($p > 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса).

Проведенный анализ результатов исследования миелограмм экспериментальных животных свидетельствовал об отсутствии влияния исследуемого препарата на клеточный состав костного мозга кроликов обоего пола. В группах, получавших дозы 2,4 мг/кг и 12 мг/кг на 30 сутки, было отмечено статистически достоверное недозозависимое увеличение процента проэритробластов по сравнению с контрольной группой (критерий Даннета, $p < 0,05$), однако индивидуальные значения находились в рамках физиологической нормы. На 45 сутки во всех группах статистически значимых различий не было выявлено.

Статистический анализ показателей мочи и сердечно-сосудистой системы не выявил достоверных различий между контрольными и опытными группами.

Проведенный анализ гематологических показателей кроликов выявил статистически достоверное изменение отдельных параметров красных и белых клеток крови, однако изменения не носили дозозависимый характер и индивидуальные значения параметров оставались в рамках физиологической нормы, что говорит об отсутствии влияния исследуемого препарата.

Результаты проведенного статистического анализа параметров гемостаза выявили статистически достоверное отклонение значений АЧТВ и тромбинового времени у самок после окончания курса введения; значений протромбинового, тромбинового времени и уровень фибриногена у самцов после восстановительного

периода; уровня фибриногена самок после восстановительного периода от значений контрольной группы. Однако изменения не носили дозозависимый характер, индивидуальные значения оставались в рамках физиологической нормы, что говорит об отсутствии влияния препарата.

Анализ результатов биохимического изучения сыворотки кроликов показал статистически достоверное колебание отдельных биохимических параметров, в частности ЛДГ, триглицеридов, аспартатаминотрансфераза (АСТ), креатинина, глюкозы и холестерина, однако изменения не носили дозозависимый характер, колебания индивидуальных значений оставались в рамках физиологической нормы, что говорит об отсутствии влияния препарата.

Некропсия, проведенная на 30 и 45 сутки эксперимента, не выявила отклонений в строении тела и структуре внутренних органов у кроликов опытных групп в сравнении с контрольной группой.

При сравнительном анализе внутренних органов кроликов патоморфологических изменений не выявлено и признаков токсического действия не обнаружено.

Гистологическое строение изучаемых образцов органов кроликов экспериментальных групп соответствует норме – гистоархитектонике внутренних органов подгрупп на 30 сутки и 45 сутки контрольной группы.

Подтверждено отсутствие у исследуемого препарата при многократном внутривенном введении в течение 28 дней местно-раздражающего действия.

Таким образом результаты исследования свидетельствуют о безопасности антитела В11-Fc.

3.4.5 Исследование иммуотоксических свойств антитела В11-Fc

Было показано, что введение препарата В11-Fc в дозах 15 мг/кг и 75 мг/кг, в сравнении с показателями группы животных, получавших плацебо, не оказывает влияние на клеточный иммунный ответ у мышей-самцов F1 (СВАхС57В1/6), обнаруживаемое в реакции гиперчувствительности замедленного типа (Рисунок 39

(А)), не влияет на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов (Рисунок 39 (Б)), на массу тела и массу иммунокомпетентных органов (Рисунок 39 (В)).

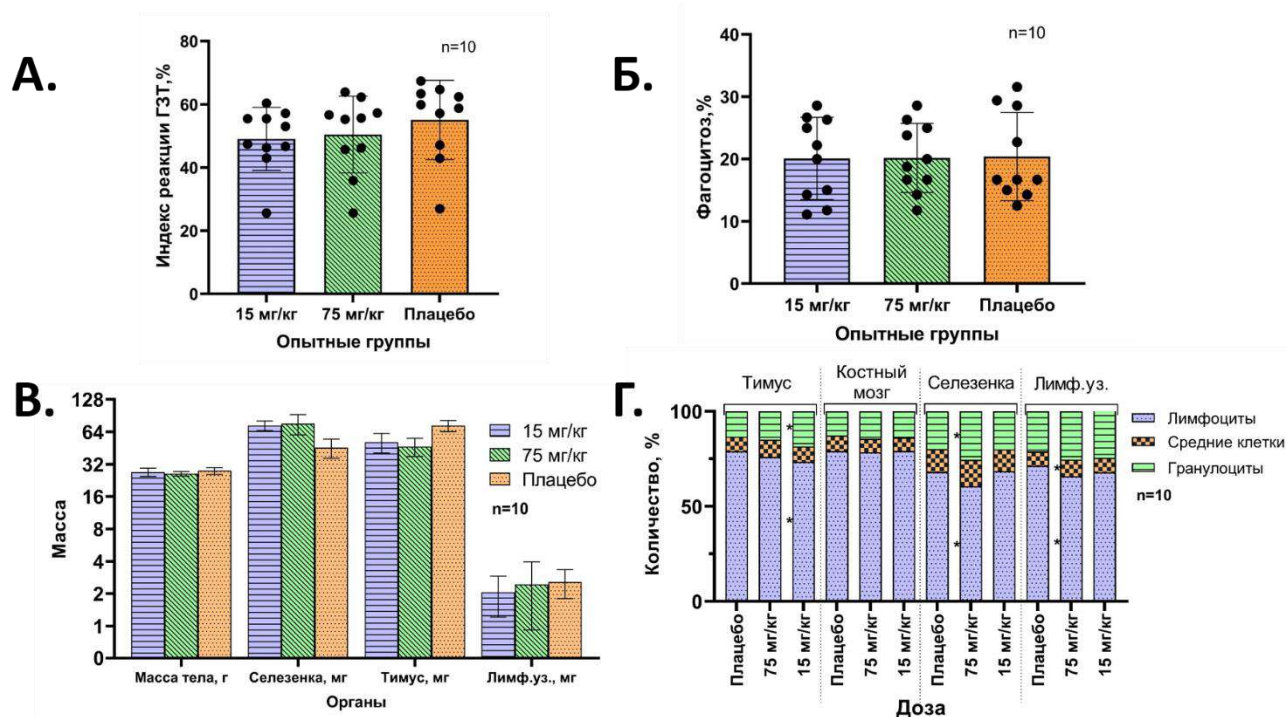


Рисунок 39 – Исследование иммунотоксических свойств антитела В11-Fc на мышьях-самцах F1 (СВАхС57В1/6). А – показатели клеточного иммунного ответа в реакции ГЗТ; Б – процент фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов; В – Соотношение средней массы тела и средней массы иммунокомпетентных органов; Г – Среднее по группам процентное соотношение иммунных клеток в различных органах (символ «*» обозначает статистически значимую разницу по сравнению с группами плацебо (критерий Даннета, $p < 0,05$)).

Введение препарата В11-Fc в дозе 15 мг/кг самцам мышья F1 (СВАхС57В1/6), в сравнении с показателями группы животных, получавших плацебо, вызывало статистически значимое снижение процентного содержания лимфоцитов и повышение процентного содержания гранулоцитов в тимусе (Рисунок 39 (Г)). Введение препарата В11-Fc в дозе 75 мг/кг самцам мышья F1 (СВАхС57В1/6), в сравнении с показателями группы животных, получавших плацебо, вызывало статистически значимое снижение процентного содержания

лимфоцитов и повышение процентного содержания гранулоцитов и общего количества гранулоцитов в селезенке, снижение процентного содержания лимфоцитов и повышение процентного содержания смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов, незрелых клеток в лимфатических узлах, снижение общего количества гранулоцитов в костном мозге.

Введение препарата В11-Fc в дозах 15 мг/кг и 75 мг/кг, в сравнении с показателями группы животных, получавших плацебо, не оказывает влияния на оцениваемый в реакции гемагглютинации гуморальный иммунный ответ на Т-зависимый антиген (эритроциты барана) у мышей линий СВА и С57В1/6 (Рисунок 40).

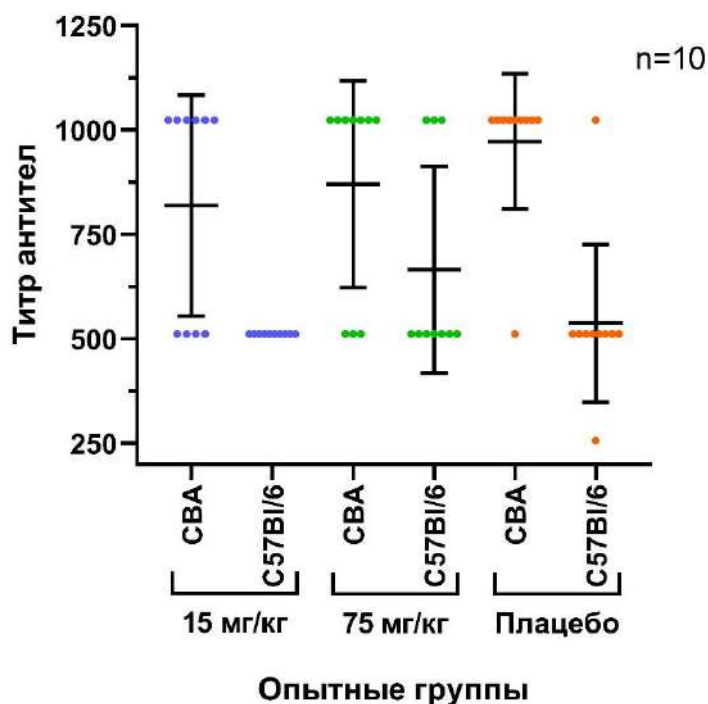


Рисунок 40 – Титр антител у мышей линий СВА и С57В1/6, иммунизированных ЭБ.

Таким образом препарат В11-Fc не имеет выраженных иммунотоксических свойств при исследовании на мышах.

3.4.6 Исследование алергизирующих свойств антитела В11-Fc

При постановке реакции общей анафилаксии на морских свинках альбиносах, у исследуемого препарата В11-Fc, в сравнении с плацебо и положительным контролем (овальбумин), не было обнаружено анафилактогенных свойств (Таблица 21).

Таблица 21 – Результаты теста общей анафилаксии: анафилактический шок (в индексах Weigle)

Группа	Количество животных	Анафилактический шок (в индексах Weigle)					Анафилактический индекс
		Количество животных, с анафилактоидными реакциями					
		++++	+++	++	+	-	
В11- Fc / 3,3 мг/кг	10♂	0	0	0	0	10	0
В11- Fc / 6,6 мг/кг	10♂	0	0	0	0	10	0
Плацебо	10♂	0	0	0	0	10	0
Овальбумин	10♂	5	2	2	1	0	3,1

Постановка теста «Конъюнктивальная проба» на морских свинках показала отсутствие реакции через 15 мин (быстрая реакция) и через 48 ч (гиперчувствительность замедленного типа) (Таблица 22).

Таблица 22 – Результаты теста «Конъюнктивальная проба»

Группа	Количество животных	Баллы через 15 мин				Баллы через 48 ч			
		1	2	3	-	1	2	3	-
В11- Fc 10 мг/кг	10♂	0	0	0	10	0	0	0	10
В11- Fc 50 мг/кг	10♂	0	0	0	10	0	0	0	10
Плацебо	10♂	0	0	0	10	0	0	0	10

Таким образом было показано отсутствие алергизирующих свойств у исследуемого препарата В11-Fc, что свидетельствует о его безопасности.

3.5 Клинические исследования безопасности кандидатного препарата на основе модифицированного однодоменного антитела В11-Fc

Популяция исследования составила 15 добровольцев, разделенных на три группы — группу 1 (Г-1) в составе 5 человек, группу 2 (Г-2) в составе 5 человек и группу 3 (Г-3) — 5 человек. Группа 1 (Г-1) получала исследуемый препарат В11-Fc однократно в дозе 0,06 мг/кг. Группа 2 (Г-2) получала исследуемый препарат В11-Fc однократно в дозе 0,3 мг/кг. Группа 3 (Г-3) получала исследуемый препарат В11-Fc однократно в дозе 0,6 мг/кг.

В результате исследования безопасности и переносимости препарата В11-Fc установлен благоприятный профиль безопасности. Основанием послужило отсутствие клинически значимых и достоверных различий по жизненно-важным показателям (САД, ДАД, ЧСС, ЧДД и температура тела), параметрам инструментальных (ЭКГ) и лабораторных исследований на протяжении всего исследования по сравнению с исходными данными на скрининге, а также в сравнении между исследуемыми группами добровольцев на протяжении всего исследования.

Всего в ходе исследования было зарегистрировано 9 нежелательных явлений в Г-1 – Г-3, связанных с соматическим статусом и изменением лабораторных показателей добровольцев. По степени тяжести 9 из 9 случаев (100 %) отнесены к категории «легкие». В 1 из 9 случаев (11,1 %) причинно-следственная связь с препаратом оценена как «вероятная», в 8 (88,9 %) – «сомнительная». Меры, предпринятые при возникновении нежелательных явлений, в 6 из 9 случаев (66,6 %) отнесены к категории «не предпринималось» и в 3 из 9 случаев (33,3 %) – к «медикаментозная терапия». Действия, предпринятые по отношению к препарату, в 9 из 9 случаев (100 %) отнесены к категории «действий не требуется (продолжение исследования согласно протоколу)». Исходом 9 из 9 случаев (100 %) стало «явление разрешилось/субъект выздоровел». Нежелательные явления были связаны с инфекциями и инвазиями — 4 из 9 случаев (44,4 %), желудочно-кишечные нарушения — 1 из 9 случаев (11,1 %), общие нарушения и реакции в месте введения — 1 из 9 случаев (11,1%), нарушения со стороны нервной системы

— 1 из 9 случаев (11,1 %), нарушения метаболизма и питания — 1 из 9 случаев (11,1 %), нарушения со стороны мышечной, скелетной и соединительной ткани — 1 из 9 случаев (11,1 %).

На основе опроса добровольцев и осмотра врачом оценивали следующие местные поствакцинальные реакции: боль, гиперемия в месте введения препарата, отек, увеличение регионарных лимфатических узлов. Во всех точках обследования для всех добровольцев групп 1–3 отмечен один признак «отсутствует», что свидетельствовало об удовлетворительной переносимости препарата по анализируемому показателю.

Также были оценены местные (отсутствовали) и общие (системные) реакции (повышение температуры тела, ухудшение самочувствия, головная боль, головокружение, снижение аппетита, бессонница, тошнота, рвота, диспепсия, слабость, потливость, боли в суставах, животе, судороги). По результатам сравнительной оценки суммарного количества общих реакций в группах 1–3 установлено отсутствие статистически значимых различий между всеми группами. Представленные данные свидетельствуют об удовлетворительной переносимости препарата.

Сравнительный анализ жизненно-важных показателей позволил установить статистически значимые различия между группами по числу дыхательных движений через 20-30 минут после введения препарата ($p=0,030$), через 12 часов после введения препарата ($p=0,030$) и утром в день 4 ($p=0,023$). Различия групп добровольцев по температуре тела так же наблюдались вечером в день 3 ($p=0,006$) и 4 ($p=0,044$), в день 5 утром ($p=0,006$) и вечером ($p=0,015$), в день 6 утром ($p=0,022$). Показатели диастолического артериального давления статистически значимо различались между группами через 1 час после введения препарата ($p=0,040$), через 5 часов ($p=0,017$), через 8 часов ($p=0,013$) и на визите 2 (день 10, $p=0,014$). Значения частоты сердечных сокращений различались между группами только вечером в день 4 ($p=0,030$) и на визите 5 (день 28, $p=0,025$). При анализе жизненно-важных показателей в динамике во всех трех группах добровольцев были установлены статистически значимые различия между точками обследования

по температуре тела. В группе 3 было отмечено умеренное снижение средних значений частоты сердечных сокращений в первые часы после введения препарата ($p=0,003$). В группе 1 через 8 и 12 часов после введения препарата наблюдалось умеренное снижение средних значений систолического артериального давления.

Статистически значимых различий между группами добровольцев по значениям показателей электрокардиографии выявлено не было. Сравнительный анализ лабораторных показателей позволил выявить различия между группами добровольцев по уровню гемоглобина на визите 1 (день 2, $p=0,031$), уровню тромбоцитов на визите 1 (день 2, $p=0,042$ и день 7, $p=0,025$), скорости оседания эритроцитов (СОЭ) на визите 1 (день 7, $p=0,015$) и визите 3 (день 14, $p=0,017$), активированному частичному тромбопластиновому времени ($p=0,021$) и международному нормализованному отношению (МНО) ($p=0,046$) на визите 1 (день 2). На визите 1 (день 7, $p=0,024$), визите 3 (день 14, $p=0,036$) и визите 5 (день 28, $p=0,042$) были установлены статистически значимые различия между изучаемыми группами добровольцев по относительному содержанию CD16+ клеток, а также по относительному содержанию CD3+ клеток на визите 1 (день 7, $p=0,049$) и уровню IgG на визите 3 (день 14). В группе 3 анализ лабораторных показателей в динамике позволил установить различия между точками обследования по значениям гематокрита ($p=0,041$), относительного содержания нейтрофилов ($p=0,024$), относительного содержания лимфоцитов на 42,4 % ($p=0,021$) и СОЭ ($p=0,012$). В группах 1 и 2 между точками обследования были установлены различия по уровням тромбоцитов ($p=0,003$ и $p=0,039$, соответственно). Среди показателей биохимического анализа крови в динамике наблюдались статистически значимые колебания уровней аланинаминотрансферазы ($p=0,029$), мочевины ($p=0,02$) и общего белка ($p=0,042$) в группе 1. В группе 3 колебались значения глюкозы ($p=0,023$) и лактатдегидрогеназы ($p=0,021$). Среди показателей иммунологического статуса после введения препарата в группе 2 изменялись показатели МНО ($p=0,015$) и тромбинового времени ($p=0,044$). В группе статистически значимые различия между точками обследования были установлены по относительному ($p=0,042$) и

абсолютному ($p=0,034$) содержанию CD3+ клеток, а также по абсолютному содержанию CD4 + клеток ($p=0,034$). В группе 2 наблюдались значимые колебания значений IgA и IgM. В группе 3 так же были установлены различия между точками обследования по уровням IgG ($p=0,019$) и IgM ($p=0,015$).

Таким образом, все описанные изменения лабораторных и инструментальных показателей добровольцев не являлись клинически значимыми.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время не существует эффективных и безопасных методов терапии, экстренной терапии и профилактики ботулизма, вызываемого ВоNT, являющегося одним из наиболее летальных веществ, встречающихся в природе. Единственным терапевтическим средством против ботулизма является антитоксин, представляющий собой очищенную сыворотку крови лошади с высокой концентрацией специфических антител. Однако сывороточные белки лошади, находящиеся в составе препарата, вызывают множественные побочные реакции у человека, такие как сывороточная болезнь, асистолия, аллергические реакции и др. Современные методы иммунологии и биотехнологии позволяют получать специфические мАт, обладающие высокой специфичностью и нейтрализующей способностью, вследствие чего нашли применение при создании препаратов против различных инфекционных заболеваний. Однако определенные присущие им структурные свойства ограничивают применимость препаратов на основе мАт для терапии интоксикаций, вызванных бактериальными токсинами. Например, большой размер мАт (150 кДа) может препятствовать доступу к сайтам связывания токсинов. Применение однодоменных антител (VНН, наноантитело) семейства верблюдовых является одним из перспективных направлений для создания терапевтических средств на их основе против токсинов. Однодоменные антитела представляют собой высокостабильный единственный антигенсвязывающий V-домен (15 кДа), что дает преимущества как для генно-инженерных манипуляций, так и для нейтрализующего потенциала. Наличие удлиненных областей CDR3 обеспечивает наибольшую эффективность в связывании антигенных эпитопов, скрытых для канонических антител. Однако однодоменные антитела имеют более короткий период циркуляции в крови, что ограничивает их терапевтическую эффективность. Слияние однодоменных с Fc-фрагментом повышает стабильность и время циркуляции антител за счет связывания с Fc-рецепторами на иммунных клетках. Кроме того, Fc-фрагменты могут обеспечивать эффекторные функции, такие как АЗКЦ и КЗЦ комплементзависимая цитотоксичность. Следовательно, модификация однодоменного антитела присоединением Fc-фрагмента

иммуноглобулина человека, является перспективным для создания средств терапии различных инфекционных заболеваний.

В лаборатории иммунобиотехнологии, при помощи иммунизации альпака и технологии фагового дисплея была получена панель однодоменных антител, специфичных к ботулотоксину типа А. Далее, при детальном изучении, было отобрано несколько наиболее перспективных клонов – В11 и G3, обладающих нейтрализующей и протективной активностью в отношении ботулотоксина типа А.

Поэтому в данной работе, отобранные ранее антитела В11 и G3, были модифицированы Fc-фрагментом IgG1 человека. Таким образом были получены рекомбинантные антитела (модифицированные однодоменные антитела) В11-Fc и G3-Fc. Получение рекомбинантных антител проводили с помощью транзientной трансфекции клеток СНО плазмидами, несущими гены антител В11-Fc и G3-Fc под контролем эукариотического промотор. Клетки яичника китайского хомяка (СНО) являются широко используемой клеточной линией для производства рекомбинантных белков и моноклональных антител. Клетки СНО имеют ряд преимуществ, таких как способность расти в суспензионной культуре, высокая продуктивность, простота генетических манипуляций. Помимо этого, данная культура является предпочтительной для получения биотехнологических продуктов, с точки зрения вирусной безопасности [219].

Кроме того, клетки СНО способны продуцировать антитела и рекомбинантные белки с оптимальным для человека профилем гликозилирования, что позволяет минимизировать иммуногенность и повысить терапевтическую эффективность моноклональных антител.

В данной работе проводили трансфекцию клеток СНО с помощью трансфецирующего реагента PEI, который является катионным полимером. Данный реагент показывает наилучшую эффективность трансфекции, что может быть связано с особенностями его структуры и механизму взаимодействия с ДНК [153]. Когда комплексы PEI-ДНК поглощаются клетками, они обычно интернализируются в эндосомы. Однако PEI способен разрушить эндосомальную

мембрану и высвободить ДНК в цитоплазму, что позволяет ей достичь ядра и транскрибироваться в РНК и затем транслироваться в белок [153].

После трансфекции проводили очистку рекомбинантных антител В11-Fc и G3-Fc из культуральной жидкости, при помощи аффинной хроматографии на сорбенте Protein A (Белок А) sepharose, позволяющей получать целевые антитела с 90% чистотой. Далее, очищенные рекомбинантные антитела В11-Fc и G3-Fc исследовали *in vitro* и *in vivo*, для определения их потенциальной защитной активности в отношении ботулотоксина типа А. В результате, наиболее перспективным оказалось антитело В11-Fc, способное обеспечивать защиту от летальных доз ботулотоксина типа А в наименьшей концентрации.

На следующем этапе работы, необходимо было получить кандидатный препарат на основе модифицированного однодоменного антитела В11-Fc. Для этого необходимо было получить клеточную линию СНО, стабильно продуцирующую антитело В11-Fc, отработать технологию ее культивирования, а также разработать эффективную и воспроизводимую технологию очистки антитела В11-Fc.

Для получения клеточной линии СНО, стабильно продуцирующей антитело В11-Fc, проводили дизайн и получение генетической конструкции (плазмиды) для оптимальной экспрессии гена антитела В11-Fc в клетках СНО. Далее, полученную плазмиду лианеризовали при помощи рестрикционного гидролиза. Линеаризация плазмидной ДНК перед трансфекцией позволяет обеспечить эффективное встраивание последовательности в геном клеток без потери целостности всех элементов плазмиды [198].

Селекцию клона-продуцента проводили с использованием возрастающих концентраций антибиотика пурамицина, поскольку уровень экспрессии антител коррелирует с устойчивостью к антибиотику [91].

Простота является еще одним важным фактором при выборе клеток СНО для производства моноклональных антител. Данная клеточная линия легко поддерживается в культуре и имеет высокую стабильность генома, с низкой склонностью к генетическим мутациям [215]. В данной работе была

экспериментально исследована и подтверждена генетическая стабильность полученного клона В7 в течение 60 пассажей, что показало воспроизводимый уровень экспрессии антител с течением времени. Это позволяет использовать полученный клон-продуцент для продукции антитела В11-Fc в различных масштабах. Для этого была создана система банков клон-продуцента.

Кроме того, важно оптимизировать условия культивирования клеток СНО, чтобы обеспечить максимальную экспрессию белка, что может включать оптимизацию таких факторов, как температура, рН и доступность питательных веществ. С этой целью была разработана схема культивирования с подпиткой, при которой выход антитела В11-Fc составил 500 мкг на 1 мл культуральной жидкости после всех стадий очисток.

Очистка антител является важным этапом в производстве терапевтических антител, поскольку чистота и активность конечного продукта имеют решающее значение для его эффективности и безопасности. Аффинная хроматография с белком А основана на высокой аффинности между Fc-областью IgG и белком А (белок клеточной стенки золотистого стафилококка). Этот метод позволяет селективно захватывать IgG из сложных смесей, обеспечивая высокую чистоту и выход [139]. После аффинной очистки было получено 59,3 мг антитела В11-Fc со 110 мл культуральной жидкости (539 мкг на 1 мл). Однако, на электрофореграмме в невозстанавливающих условиях заметны примеси в виде агрегированных форм антитела. Данные примеси удаляли на последующих стадиях очистки.

Анионообменная очистка является широко используемым методом очистки антител. Этот метод основан на взаимодействии между примесями агрегатов, остаточных белков и ДНК штамма-продуцента, и отрицательно заряженными функциональными группами на неподвижной фазе.

Мультимодалная хроматографическая очистка на гидроксиапатите представляет собой универсальный метод, который сочетает в себе различные способы взаимодействия для достижения высокой селективности и эффективности очистки антител. Гидроксиапатит представляет собой минерал фосфата кальция, который содержит как положительно, так и отрицательно заряженные группы на

своей поверхности. Это свойство позволяет связывать антитела за счет комбинации гидрофобных, электростатических и водородных взаимодействий. На этой стадии очистки, происходит эффективное отделение целевой фракции препарата от агрегатов за счет разницы в их заряде. Целевая мономерная фракция антитела В11-Fc элюируется с колонки 20 мм фосфатным буфером (рН = 7.3), в то время как агрегаты остаются связанными с сорбентом. Таким образом после всех стадий очисток был получен препарат антитела В11-Fc с высокой степенью чистоты от примесей, достаточной для проведения дальнейших исследований эффективности и безопасности.

Увеличенный период полувыведения Fc-слитых антител достигается за счет связывания с неонатальным Fc-рецептором FcRn в организме. Кроме этого, связывание и передача сигналов через гамма-рецепторы Fc FcγR является важным свойством Fc-фрагмента [19, 171]. Эти рецепторы экспрессируются на поверхности многих популяций иммунных клеток, особенно антигенпрезентирующих клеток, таких как моноциты, макрофаги, дендритные клетки и В-клетки. FcγR опосредуют взаимодействия антигенпрезентирующих клеток с IgG-опсонизированными частицами, что приводит к активации или ингибированию иммунных сигналов. Кроме того, FcγR также может экспрессироваться на поверхности гранулоцитов, включая нейтрофилы, базофилы, эозинофилы и тучные клетки, а также на естественных клетках-киллерах. Взаимодействия Fc-FcγR могут активировать или ингибировать различные популяции иммунных клеток, что приводит к различным иммунным реакциям. Таким образом, взаимодействия Fc-FcγR могут влиять на иммуногенность терапевтических средств, слитых с Fc-фрагментом. Взаимодействия Fc-FcγR обеспечивает влияние на поглощение, процессинг и представление антигена дендритными клетками.

Другим важным биологическим взаимодействием области Fc является взаимодействие с компонентом комплемента C1q, который запускает классический путь активации. Через C1q система комплемента взаимодействует с Fc-фрагментами через иммунные комплексы, что приводит к воспалению, активации фагоцитов и очистке от опсонизированных антигенов посредством фагоцитоза и

лизиса клеток и патогенов. Следовательно, взаимодействия Fc-C1q также могут влиять на иммунные реакции терапевтических антител, слитых с Fc [72].

В данной работе было показано, что антитело B11-Fc имеет высокое значение константы связывания с различными Fc-рецепторами, в том числе FcRn, FcγR и белком системы комплемента C1q, что дополнительно обеспечивает длительный период полувыведения препарата, а также высокие иммунные реакции, направленные на элиминирование BoNT/A из организма.

Для исследования эффективности мАт используются животные модели заболеваний. Однако антитела, содержащие человеческий Fc-фрагмент, могут вызывать выраженный иммунный ответ [210]. Тем не менее, исследования на животных является важным этапом доклинических исследований: исследования токсичности, оценка фармакокинетики, определение распределения антител и т.д. Иммуногенность гуманизированных мАт у мышей представляет собой проблему только для иммунокомпетентных животных: мыши, лишённые В- и Т-клеток, совершенно неспособны развивать иммунный ответ на чужеродные белки. У бестимусных мышей, имеющих дефицит Т-клеток, также не вырабатываются антитела к человеческому IgG, поскольку он является Т-клеточно-зависимый антигеном [137]. Таким образом, иммунный ответ против мАт IgG у иммунокомпетентных животных (грызунов или приматов) возникает с некоторой задержкой и не мешает краткосрочным экспериментам.

По этическим причинам было невозможно использовать нечеловеческих приматов для модели ботулизма. В данной работе мыши инбредной линии BALB/c были выбраны для исследований интоксикации, поскольку было описано их использование в других работах, посвященных разработке терапевтических антитоксинов [51, 151]. Более того, симптомы развития заболевания (прогрессирующий паралич, приводящий к смерти) сопоставимы между грызунами, макаками-резусами и людьми. Однако у грызунов наблюдается раннее появление клинических признаков интоксикации, в виде мышечной слабости и респираторного дистресса, после чего происходит прогрессирование этих состояний, приводя к параличу и смерти. Типичные ранние проявления болезни у

макак-резусов включают птоз, дисфагию, мышечную слабость, респираторный дистресс и полный паралич [120]. Общее прогрессирование интоксикации у грызунов сравнимо с симптомами, наблюдаемыми у макак-резусов и людей [78]. Таким образом, модель на мышах линии BALB/c является показательной и воспроизводимой для оценки терапии интоксикации ВоNT/A.

Токсин может доставляться в модельный организм различными парентеральными путями, что является наиболее простым способом интоксикации, позволяя, таким образом, жестко контролировать эффективность воздействия токсина на организм. При сравнительном изучении литературы о различных путях введения ВоNT было выяснено, что мыши более восприимчивы к интоксикации путем внутрибрюшинного введения, чем внутрижелудочного или ингаляционного. Внутрижелудочная LD₅₀ примерно в 70-5000 раз выше по сравнению с внутрибрюшинной LD₅₀ в зависимости от серотипа токсина [78], что было продемонстрировано в работе: LD₅₀ ВоNT/A, используемая для внутрижелудочного введения (12000 LD₅₀) в 2400-1200 раз соответственно превышала LD₅₀, используемую для внутрибрюшинного введения мышам (5-10 LD₅₀).

Несмотря на то, что внутрижелудочный и ингаляционный пути являются наиболее вероятными путями попадания ВоNT в организм человека, путь воздействия не имеет важного значения, поскольку патогенез ботулотоксина обусловлен токсемией, вызывающей распространение токсина по всему организму. Тем не менее, сегодня недостаточно информации о распространении ВоNT в организме после внутрижелудочной интоксикации. Однако известно, что по сравнению с внутрибрюшинной интоксикацией, кроме устойчивости к повышенным дозам токсина, возникает отсрочка времени наступления симптомов. Это является отличительной чертой модели внутрижелудочной интоксикации, наиболее приближенной к реальному заболеванию, поскольку симптомы ботулизма у людей обычно развиваются 12-36 часов [32, 173, 42]. Более того, ранними симптомами являются нечеткость зрения, сухость во рту, диплопия, птоз и трудности с речью [51], однако животные, особенно грызуны, не проявляют

описываемых симптомов и не могут сообщить о них. Поэтому для данного исследования появление симптомов средней тяжести у мышей в виде дисфагии и слабости дыхательных мышц спустя 16 часов при введении 12000 LD₅₀ внутрижелудочным путем позволило приблизить модель интоксикации мышей к реальной картине интоксикации. Длительность развития симптомов составляла 3 и 16 часов для внутрижелудочной и внутрибрюшинной моделей соответственно, а летальность после интоксикации составила 8 и 24 часа соответственно. Это позволило оценить защитный потенциал исследуемого антитела B11-Fc в различных режимах терапии и профилактики.

На острой внутрибрюшинной модели интоксикации мышей 10 LD₅₀ BoNT/A была подобрана протективная доза антитела B11-Fc 0,6 мг/кг веса животного, которая обеспечивала 100% защиту животных без признаков интоксикации в течение 5 суток. Кроме того, данная доза была изучена на потенциальную защиту против увеличенных доз BoNT/A. Было показано, что 100% защита мышей достигается против 5, 10 и 20 LD₅₀. Доза 50 LD₅₀ вызывает гибель 40% группы мышей; 100 LD₅₀ – 70% группы. Таким образом, был продемонстрирован терапевтический потенциал полученного антитела B11-Fc от высоких доз токсина, несмотря на то что доза 5 LD₅₀ считается дозой, достаточной для подтверждения эффективной нейтрализации токсина [143, 208]. Изучение защиты от интоксикации на внутрибрюшинной модели в режиме профилактики показали эффективную защиту от 5 LD₅₀ BoNT/A в течение 21 суток, однако полученный результат можно считать минимальным значением для человека, поскольку циркуляция гуманизированных антител в организме мыши заметно снижена исходя из вышеописанной проблемы иммуногенности. Данный факт подтверждается подобными сравнительными исследованиями фармакокинетики [211, 212]. Изучение возможности экстренной профилактики интоксикации показало низкую эффективность применения антитела B11-Fc на острой модели интоксикации: при использовании антител спустя 4 часа после введения 5 LD₅₀ BoNT/A была показана 40% выживаемость мышей. Это связано с описанными ранее факторами быстрой доставки BoNT/A к мишени и скорого прогрессирования заболевания без возможности оценки наличия начальных симптомов в виде ухудшения зрения и др.

Поэтому для оценки возможности экстренной профилактики и терапии использовали внутрижелудочную модель интоксикации, эксперименты на которой показали, что эффективная защита мышцей достигается при применении антитела В11-Fc до начала развития симптомов ботулизма, проявляющихся в виде спазма диафрагмы и прилежащих к ней мышц живота и абдоминального дыхания. Однако, показанные симптомы у людей развиваются значительно медленнее, а также развиваются дополнительные легкие симптомы, описанные ранее, что дает возможность успешного применения антитела В11-Fc при ранней диагностике заболевания, до развития дыхательной недостаточности (в среднем около 24-56 часов) [32, 173].

Показанная защита от высоких доз ВоNT/A при внутрижелудочной интоксикации при той же концентрации антитела В11-Fc 0,6 мг/кг, используемой для нейтрализации 10 LD₅₀ ВоNT/A внутривенно, объясняется тем, что большая часть токсина, вероятно, расщепляется или выводится из организма. Несмотря на то, что для внутрижелудочной интоксикации использовали ВоNT/A в виде полноразмерного комплекса, известно, что только голотоксин ВоNT является формой, которая обнаружена в кровотоке после интоксикации [169]. Считается, что комплекс ВоNT/A диссоциирует в крови из-за его высокого содержания гемагглютинаина, а самого голотоксина достаточно для транслокации в организме [189].

Для доклинического исследования фармакокинетики антитела В11-Fc были использованы кролики Шиншилла, поскольку они являются релевантным видом для исследования фармакокинетики, рекомендованы Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [7]. Использование данного вида животных является обязательным для получения объективных данных по фармакокинетики лекарственного средства для дальнейшего получения разрешения на клинические исследования. Полученные в исследовании данные свидетельствуют о быстром достижении максимальной концентрации в крови (0,5 ч), что объясняется непосредственным внутривенным введением в организм. Значения фармакокинетического профиля имеют прямо пропорциональный дозозависимый характер.

Для оценки острой токсичности и местного раздражающего действия использовали аутбредных мышей и крыс, поскольку они являются стандартными объектами токсикологических исследований. В результате введения антитела В11-Fc крысам не было выявлено никаких клинических признаков, связанных с жизнеспособностью, значимым изменением массы, двигательной активностью, поведением, респираторных показателей, рефлексов, глазных признаков и др. Макроскопическое и морфометрическое исследование внутренних органов показало отсутствие влияния изучаемого антитела В11-Fc. Незначительное увеличение массы тимуса у самцов мышей может быть нормальной реакцией на вводимый антиген, приводящий к возрастанию плотности клеток в кортексе тимуса [8], а половое различие может быть следствием гормонального статуса мыши [50]. Увеличение массы печени самок крыс может быть обусловлено половыми различиями в метаболизме. Однако данные результаты острой токсичности, а также отсутствие признаков местнораздражающего действия суммарно демонстрируют отсутствие значимого токсического действия на организм.

При исследовании токсичности и местной токсичности при многократном введении антитела В11-Fc использовали аутбредных крыс, поскольку они являются релевантным видом для исследования токсичности и рекомендованы Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [7]. Использование данного вида животных обязательно необходимо для получения объективных данных по безопасности ЛС для получения разрешения на клинические исследования. Анализ миелограммы выявил в группе, получавшей 7,5 мг/кг статистически значимое увеличение процента лимфоцитов по сравнению с контрольной группой; в группе, получавшей 30 мг/кг – увеличение процента моноцитов по сравнению с контрольной группой. Указанные изменения не носили дозозависимый характер, что говорит об отсутствии влияния препарата. Анализ результатов гематологического исследования выявил у самцов экспериментальных групп после окончания курса введения препарата на 29 сутки дозозависимый сдвиг лейкоцитарной формулы в сторону увеличения процента лимфоцитов и снижения процента средних клеток. Отмеченные изменения сохранялись после

восстановительного периода, что может быть связано с природой препарата и его фармакологической активностью. У самок сдвиг лейкоцитарной формулы отмечали после восстановительного периода в минимальной дозе равной 7,5 мг/кг, что также может объясняться природой препарата. Другие изменения при оценке антитела В11-Fc не носили дозозависимый характер, что говорит об отсутствии влияния препарата. При сравнительном анализе внутренних органов крыс на 29 и 43 сутки исследования патоморфологических изменений не было выявлено, а также не обнаружены признаки цитотоксического действия, что свидетельствует о безопасности антитела В11-Fc.

Для исследования иммунотоксических свойств антитела В11-Fc использовали мышей гибридов F1 (СВАхС57В1/6), а также мышей линий СВА и С57В1/6, поскольку они являются релевантными видами для исследования иммунотоксических свойств и рекомендованы Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [7]. Использование данного вида животных необходимо для получения объективных данных по безопасности ЛС для получения разрешения на клинические исследований. Было показано, что введение антител В11-Fc в дозах 15 мг/кг и 75 мг/кг не оказывает влияния на гуморальный иммунный ответ.

Обобщая полученные результаты по доклиническим исследованиям безопасности можно сделать вывод об отсутствии влияния препарата на основе модифицированного однодоменного антитела В11-Fc на исследуемые показатели: все полученные значения находятся в границах значений нормы или эффекты не носят дозозависимый характер.

Результаты I фазы клинических исследований показали благоприятный профиль безопасности и удовлетворительную переносимость препарата на основе модифицированного однодоменного антитела В11-Fc. Основанием послужило отсутствие клинически значимых достоверных различий жизненно-важных показателей, параметров инструментальных (ЭКГ) и лабораторных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате диссертационной работы был получен кандидатный препарат, содержащий в составе антитело В11-Fc, представляющее собой однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека, обладающее специфической и нейтрализующей активностью против ВоNT/A. Дополнительно была изучена возможность применения препарата на основе изученных антител для экстренной профилактики и терапии ботулизма.

Используя методы молекулярной биотехнологии, была получена клеточная линия СНО, стабильно продуцирующая модифицированное однодоменное антитело В11-Fc, специфичное к ботулиническому токсину А. При помощи оптимизации условий культивирования и хроматографической очистки был получен кандидатный препарат на основе антитела В11-Fc. При помощи различных методов было подтверждено качество полученного препарата, а также его чистота.

Полученные экспериментальные данные демонстрируют эффективность полученного кандидатного препарата на основе модифицированного однодоменного антитела В11-Fc на различных моделях интоксикации мышей. Применение антитела В11-Fc эффективно для экстренной профилактики и терапии ботулизма при введении до наступления симптомов ботулизма средней тяжести, проявляющихся в виде спазма диафрагмальной мышцы и нарушении дыхания. Кроме того, показана возможность краткосрочной профилактики ботулизма в течение 3 недель, что достигается благодаря наличию у однодоменного антитела Fc-фрагмента. За счет полученной модификации, В11-Fc обладает аффинностью и способностью связывания с различными классами человеческих Fc-рецепторов, а также возможностью активации белков системы комплемента.

Проведенные доклинические и I фаза клинических исследований кандидатного препарата на основе модифицированного однодоменного антитела В11-Fc продемонстрировали безопасность и хорошую переносимость полученного препарата ввиду отсутствия влияния на различные иммунологические, биохимические и другие показатели организма животных. В дальнейшем планируется продолжение проведения клинических исследований полученного кандидатного препарата.

ВЫВОДЫ

1. На основе модифицированного однодоменного антитела создан кандидатный препарат для терапии и экстренной профилактики ботулизма, обеспечивающий 100%-ную защиту животных от летальной дозы 20 LD₅₀ BoNT/A в дозе 0,6 мг/кг;

2. Разработана технология получения кандидатного препарата на основе модифицированного однодоменного антитела B11-Fc, включающая культивирование клеточной линии-продуцента и трехступенчатую хроматографическую очистку модифицированного однодоменного антитела B11-Fc;

3. В результате изучения физико-химических и иммунологических характеристик кандидатного препарата показано, что его чистота при получении достигает 99%; определен гликановый профиль антитела B11-Fc и его размер, определены константы равновесных диссоциаций взаимодействия Fc-фрагмента антитела B11-Fc с Fc-рецепторами человека: FcRn $3,1 \times 10^{-8} \text{M}$, CD16a $2,3 \times 10^{-8} \text{M}$, CD16b $4,2 \times 10^{-9} \text{M}$, CD32a $4,6 \times 10^{-8} \text{M}$, CD32b $4,5 \times 10^{-8} \text{M}$, γRI $2,6 \times 10^{-8} \text{M}$, изучена способность антитела B11-Fc взаимодействовать с белком системы комплемента C1q;

4. На модели острой внутрибрюшинной интоксикации лабораторных мышей продемонстрировано, что полученный кандидатный препарат способен обеспечивать полную защиту животных от 5 LD₅₀ BoNT/A в течение 21 суток после внутривенного введения (краткосрочная профилактика);

5. На модели внутрижелудочной интоксикации лабораторных мышей 12000 LD₅₀ BoNT/A, продемонстрировано, что полученный кандидатный препарат способен обеспечивать полную защиту животных при ведении не позднее 14 часов после интоксикации, 60%-ную защиту животных при ведении не позднее 16 часов после интоксикации и 50%-ную защиту животных при ведении не позднее 18 часов после интоксикации;

6. В результате доклинических исследований и клинических исследований I фазы была подтверждена безопасность и хорошая переносимость кандидатного препарата на основе антитела B11-Fc.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АЗКФ – антителозависимый клеточный фагоцитоз
- АЗКЦ – антителозависимая клеточная цитотоксичность
- АСТ – аспаратаминотрансфераза
- АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время
- БКЯ – раствор белка куриного яйца
- БОЕ – бляшкообразующая единица
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа
- ДКИ – доклинические исследования
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДНК (DNA) – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИВЛ – искусственная вентиляция легких
- ИР – индекс реакции
- ИФА – иммуноферментный анализ
- кДа – единица измерения молекулярной массы
- кДНК – кодирующая ДНК
- КЗЦ – комплемент-зависимая цитотоксичность,
- КОЕ – колониеобразующая единица
- КПЭ – клетки перитонеального экссудата
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа
- ЛС – лекарственное средство
- мАт – моноклональное антитело
- мРНК – матричная РНК
- п.н – пары нуклеотидов
- ПААГ – полиакриламидный гель
- пАт – поликлональное антитело
- ПЦР (PCR) – полимеразная цепная реакция
- ТЦАт – антитела, состоящие только из тяжелых цепей

PBMC – моноклеарные клетки периферической крови (peripheral blood mononuclear cell)

РНК (RNA) – рибонуклеиновая кислота

СНО – линия клеток яичников китайского хомячка (chinese hamster ovary cells)

т.п.н – тысяча пар нуклеотидов

Твин – полиоксиэтиленсорбитана монолаурат

ЦНС – центральная нервная система

ЭБ – эритроциты барана

ЭДТА (EDTA) – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭКГ – электрокардиография

AdHu5 – аденовирус человека 5-го серотипа

Arg – аминокислота аргинин

Asn– аминокислота аспарагин

BoNT – ботулинистический нейротоксин (botulinum neurotoxin)

BSA (БСА) – бычий сывороточный альбумин

CD – кластер дифференцировки

CDC – центры по контролю и профилактике заболеваний (centers for disease control and prevention)

CDR – гипервариабельная область иммуноглобулина CDR (complementarity-determining regions)

CH – константный домен тяжёлой цепи иммуноглобулина

Cmax– максимальная концентрация вещества

DPBS – фосфатносолевой буфер Дульбекко

DTT (ДТТ) – дитиотреитол

EGFP – ген усиленного зеленого флуоресцирующего белка (enhanced green fluorescent protein)

F1 – первое поколение

Fab – антигенсвязывающий фрагмент антитела

Fc – кристаллообразующий фрагмент (fragment crystallizable)

FcRn – неонатальный рецептор Fc

Fc γ – рецептор, ответственный за распознавание Fc-фрагмента молекул иммуноглобулинов

Fr – каркасные участки молекулы антитела (framework regions)

Fv – переменная область (variable fragment)

Glu– аминокислота глутамин

Gly – аминокислота глицин

GlySer – глицин-сериновый линкер

GRAN – гранулоциты

HA – гемагглютинин

HAMA – человеческие противомышиные антитела (human anti-mouse antibodies)

HAT – гипоксантин-аминоптерин-тимидин

HVAT – лошадиная антитоксическая сыворотка

HC – тяжелые (heavy) цепи иммуноглобулина

HGB – концентрация гемоглобина

HGPRT – гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза

HRP – пероксидаза хрена (enzyme horseradish peroxidase)

Ig – иммуноглобулин

IgA – иммуноглобулин класса A

IgE – иммуноглобулин класса E

IgG – иммуноглобулин класса G

K_D – константа диссоциации

LC – легкие (light) цепи

LD₅₀ – полужетальная доза

Leu – аминокислота лейцин

LYM – лимфоциты

Man – манноза

MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците

MCV – средний объем эритроцитов

MID – средние клетки

MOI – множественность инфекционных единиц

NAP – neurotoxin associated proteins (нейротоксин-ассоциированных пептидов)
NTNH – нетоксичный негемагглютинин
OD (ОП) – оптическая плотность
OD450 – оптическая плотность при 450 нм
ОКТ3 – моноклональное антилимфоцитарное антитело Orthoclone
OptiMEM – оптимизированная среда Игла
PBST – фосфатносолевой буфер, содержащий детергент твин
PCT – тромбокрит
PEG (ПЭГ) - полиэтиленгликоль
PEI – полиэтиленимин (polyethylenimine)
pH – водородный показатель
Phe – аминокислота фенилаланин
pIII – белок III оболочки бakteоориофага
PLT – тромбоциты
RDW-CV – широта распределения популяции эритроцитов (коэффициент вариации)
RDW-SD – широта распределения популяции эритроцитов (стандартное отклонение)
S – субъединица
scFv – переменные фрагменты антитела, соединенные в одну цепь
SDS – додецилсульфат натрия
SNARE – транспортные белки (soluble NSF attachment receptor)
T max – максимальная концентрация
T_{1/2} – период полувыведения
TAE – триацетатный буфер
TBS – буфер на основе трис(гидроксиметил)аминометана
TeNT – нейротоксин, который вырабатывается анаэробным возбудителем столбняка *Clostridium tetani*
TGB – трис-глициновый буфер

TMDD – мишень-опосредованной диспозиция лекарственного средства (target-mediated drug disposition)

Tris – гидрооксиметиламинометан

Trp – аминокислота триптофан

Val – аминокислота валин

VAMP – синтаксин (vesicle associated membrane protein)

VH – переменный домен тяжелой цепи канонического иммуноглобулина

VHH – однодоменные антитела, наноантитела (variable domain of the heavy chain of the heavy chain antibody)

VHH-Fc – однодоменные антитела, модифицированные Fc-фрагментом (рекомбинантные антитела, состоящие только из тяжелых цепей)

VL - переменный домен легкой цепи канонического иммуноглобулина

WBC – лейкоциты

ЕОДУ (NPHO) – национальная организация общественного здравоохранения (national public health organization)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бем, А. Э. Концепция мишень-опосредованного лекарственного распределения высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений / А. Э. Бем, А. Р. Касимова, Ю. М. Гомон, А. С. Колбин // *Лекарственный вестник*. – 2021. – Т. 15. – №. 3. – С. 3-12.
2. Дорохов, Ю. Л. Роль углеводных остатков в функционировании иммуноглобулина G человека и терапевтических моноклональных антител (обзор) / Ю. Л. Дорохов, Е. В. Шешукова, Е. Н. Кособокова [и др.] // *Биохимия*. – 2016. – Т. 81. – №. 8. – С. 1069-1090.
3. Есмагамбетов, И. Б. Наноантитела-потенциальный терапевтический препарат против лихорадки Эбола / И. Б. Есмагамбетов, Д. В. Щебляков, Д. А. Егорова [и др.] // *Acta Naturae* (русскоязычная версия). – 2021. – Т. 13. – №. 4. – С. 53-63.
4. *Здравоохранение в России* // *Стат.сб./Росстат*. – 2019. – М., 3-46 – 170 с. – ISBN 978-5-89476-470-2.
5. Макарова, И. В. Клинико-эпидемиологическая характеристика пищевого ботулизма в Волгограде / И. В. Макарова, А. В. Осипов, Е. А. Иоанниди // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. – 2014. – №. 1 (49). – С. 52-53.
6. Мельник, А. А. Применение иммунобиологических лекарственных препаратов на основе моноклональных антител в нефрологической практике / А. А. Мельник // *Почки*. – 2018. – Т. 7. – №. 3. – С. 224-236.
7. Миронов, А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств // М.: Гриф и К. – 2012. – Т. 944.
8. Полевщиков, А. В. Динамика морфологических изменений в тимусе мыши после иммунизации / А. В. Полевщиков, О. В. Гурова, М. Д. Зассеева [и др.] // *Тихоокеанский медицинский журнал*. – 2014. – №. 4 (58). – С. 41-45.
9. Харченко, Г. А. Ботулизм в Астраханской области: ретроспективное исследование / Г. А. Харченко, О. Г. Кимирилова, А. А. Кимирилов // *Детские инфекции*. – 2022. – Т. 21. – №. 1 (78). – С. 33-40.
10. Adekar, S. P. Neutralization of botulinum neurotoxin by a human monoclonal antibody specific for the catalytic light chain / S. P. Adekar, T. Takahashi, R. M. Jones [et al.] // *Plos one*. – 2008. – Vol. 3. – №. 8. – P. e3023.
11. Ahmad, Z. A. scFv antibody: principles and clinical application / Z. A. Ahmad, S. K. Yeap, A. M. Ali [et al.] // *Clinical and developmental immunology*. – 2012. – Vol. 2012.
12. Anniballi, F. Botulism in Italy, 1986 to 2015 / F. Anniballi, B. Auricchio, A. Fiore [et al.] // *Eurosurveillance*. – 2017. – Vol. 22. – №. 24. – P. 30550.
13. Anniballi, F. New targets in the search for preventive and therapeutic agents for botulism / F. Anniballi, D. Lonati, A. Fiore [et al.] // *Expert Review of Anti-infective Therapy*. – 2014. – Vol. 12. – №. 9. – P. 1075-1086.
14. Ansar, W. Monoclonal antibodies: a tool in clinical research / W. Ansar, S. Ghosh // *Indian Journal of Clinical Medicine*. – 2013. – Vol. 4. – P. 9–12.

15. Arnon, S. S. Human botulism immune globulin for the treatment of infant botulism / S. S. Arnon, R. Schechter, S. E. Maslanka [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2006. – Vol. 354. – №. 5. – P. 462-471.
16. Baghban, R. Camelid-derived heavy-chain nanobody against *Clostridium botulinum* neurotoxin E in *Pichia pastoris* / R. Baghban, S. L. M. Gargari, M. Rajabibazl [et al.] // *Biotechnology and applied biochemistry*. – 2016. – Vol. 63. – №. 2. – P. 200-205.
17. Barrera, D. J. Algal chloroplast produced camelid VHH antitoxins are capable of neutralizing botulinum neurotoxin / D. J. Barrera, J. N. Rosenberg, J. G. Chiu [et al.] // *Plant biotechnology journal*. – 2015. – Vol. 13. – №. 1. – P. 117-124.
18. Baxter, L. T. Physiologically based pharmacokinetic model for specific and nonspecific monoclonal antibodies and fragments in normal tissues and human tumor xenografts in nude mice / L. T. Baxter, H. Zhu, D. G. Mackensen, R. K. Jain // *Cancer research*. – 1994. – Vol. 54. – №. 6. – P. 1517-1528.
19. Beck, A. The next generation of antibody-drug conjugates comes of age / A. Beck, J. F. Haeuw, T. Wurch [et al.] // *Discovery medicine*. – 2010. – Vol. 10. – №. 53. – P. 329-339.
20. Ben Abderrazek, R. Development of Cys38 knock-out and humanized version of NbAahII10 nanobody with improved neutralization of AahII scorpion toxin / R. Ben Abderrazek, C. Vincke, C. Hmila [et al.] // *Protein Engineering, Design & Selection*. – 2011. – Vol. 24. – №. 9. – P. 727-735.
21. Berdeja, J. Pharmacokinetics and safety of elotuzumab combined with lenalidomide and dexamethasone in patients with multiple myeloma and various levels of renal impairment: results of a phase Ib study / J. Berdeja, S. Jagannath, J. Zonder [et al.] // *Clinical lymphoma myeloma and leukemia*. – 2016. – Vol. 16. – №. 3. – P. 129-138.
22. Berger, M. Therapeutic applications of monoclonal antibodies / M. Berger, V. Shankar, A. Vafai // *The American journal of the medical sciences*. – 2002. – Vol. 324. – №. 1. – P. 14-30.
23. Bernett, M. J. Engineering fully human monoclonal antibodies from murine variable regions / M. J. Bernett, S. Karki, G. L. Moore [et al.] // *Journal of molecular biology*. – 2010. – Vol. 396. – №. 5. – P. 1474-1490.
24. Berry, J. D. Antibodies in infectious diseases: polyclonals, monoclonals and niche biotechnology / J. D. Berry, R. G. Gaudet // *New biotechnology*. – 2011. – Vol. 28. – №. 5. – P. 489-501.
25. Black, R. E. Hypersensitivity reactions associated with botulinal antitoxin / R. E. Black, R. A. Gunn // *The American journal of medicine*. – 1980. – Vol. 69. – №. 4. – P. 567-570.
26. Botulism [Электронный ресурс] // National Public Health Organization (EODY) – 2021 – URL: <https://eody.gov.gr/disease/allantiasi/> (дата обращения: 02.03.2022). – Текст: электронный.
27. Botulism Annual Summary, 2014 [Электронный ресурс] // Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human

Services, CDC – 2015 – URL: https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/botulism_cste_2014.pdf (дата обращения: 07.05.2022). – Текст: электронный.

28. Botulism Annual Summary, 2015 [Электронный ресурс] // Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human

Services, CDC – 2017 – URL: https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/botulism_cste_2015.pdf (дата обращения: 20.06.2022). – Текст: электронный.

29. Botulism Annual Summary, 2016 [Электронный ресурс] // Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human

Services, CDC – 2017 – URL: <https://www.cdc.gov/botulism/pdf/Botulism-2016-SUMMARY-508.pdf> (дата обращения: 06.05.2022). – Текст: электронный.

30. Botulism Annual Summary, 2017 [Электронный ресурс] // Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human

Services, CDC – 2019 – URL: <https://www.cdc.gov/botulism/surv/2017/index.html> (дата обращения: 15.10.2022). – Текст: электронный.

31. Botulism Annual Summary, 2018 [Электронный ресурс] // Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human

Services, CDC – 2021 – URL: <https://www.cdc.gov/botulism/surv/2018/index.html> (дата обращения: 23.10.2022). – Текст: электронный.

32. Botulism, 2020 [Электронный ресурс] // Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC – 2022 – URL: <https://www.cdc.gov/botulism/index.html> (дата обращения: 11.11.2022). – Текст: электронный.

33. Botulism-annual epidemiological report for 2015 [Электронный ресурс] // European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Atlanta, GA – 2018. – URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/botulism-annual-epidemiological-report-2015> (дата обращения: 15.04.2022). – Текст: электронный.

34. Brezski, R. J. Application of antibody engineering in the development of next generation antibody-based therapeutics / R. J. Brezski, J. C. Almagro // Development of Antibody-Based Therapeutics: Translational Considerations. – 2012. – P. 65-93.

35. Caleo, M. Exploiting botulinum neurotoxins for the study of brain physiology and pathology / M. Caleo, L. Restani // Toxins. – 2018. – Vol. 10. – №. 5. – P. 175.

36. Camerini, S. Type E botulinum neurotoxin-producing *Clostridium butyricum* strains are aerotolerant during vegetative growth / S. Camerini, L. Marcocci, L. Picarazzi [et al.] // Msystems. – 2019. – Vol. 4. – №. 2. – P. e00299-18.

37. Carter, A. T. Genomes, neurotoxins and biology of *Clostridium botulinum* Group I and Group II / A. T. Carter, M. W. Peck // Research in microbiology. – 2015. – Vol. 166. – №. 4. – P. 303-317.

38. Cartwright, A. N. R. The immune synapse clears and excludes molecules above a size threshold / A. N. Cartwright, J. Griggs, D. M. Davis // Nature communications. – 2014. – Vol. 5. – №. 1. – P. 5479.

39. Casadevall, A. The third age of antimicrobial therapy / A. Casadevall //Clinical Infectious Diseases. – 2006. – Vol. 42. – №. 10. – P. 1414-1416.
40. Cebrián, J. Electrophoretic mobility of supercoiled, catenated and knotted DNA molecules / J. Cebrián, M. J. Kadomatsu-Hermosa, A. Castán [et al.] //Nucleic acids research. – 2015. – Vol. 43. – №. 4. – P. e24-e24.
41. Cenciarelli, O. Biosecurity threat posed by botulinum toxin / O. Cenciarelli, P. W. Riley, A. Baka //Toxins. – 2019. – Vol. 11. – №. 12. – P. 681.
42. Chaidoutis, E. Foodborne botulism: A brief review of cases transmitted by cheese products / E. Chaidoutis, D. Keramydas, P. Papalexis [et al.] //Biomedical Reports. – 2022. – Vol. 16. – №. 5. – P. 1-7
43. Chandel, P. Pharmaceutical monoclonal antibodies: Production, guidelines to cell engineering and applications / P. Chandel, S. L. Harikumar //Int J Pharm Pharm Sci – 2013. – Vol. 20.
44. Chang, A. Y. Preparation of calcium competent Escherichia coli and heat-shock transformation / A. Y. Chang, V. Chau, J. A. Landas, Y. Pang //JEMI methods. – 2017. – Vol. 1. – №. 22-25.
45. Chang, G. Y. Early antitoxin treatment in wound botulism results in better outcome / G. Y. Chang, G. Ganguly //European neurology. – 2003. – Vol. 49. – №. 3. – P. 151-153.
46. Chang, T. W. Developing antibodies for targeting immunoglobulin and membrane-bound immunoglobulin E / T. W. Chang //Allergy and asthma proceedings. – OceanSide Publications, 2006. – Vol. 27. – №. 2. – P. 7.
47. Charizani, F. Infections and preventive measures / F. Charizani. – Papazisis, Athens, Greece, 2004. – 344 p. – ISBN: 960-02-1804-8.
48. Chatham-Stephens, K. Clinical features of foodborne and wound botulism: a systematic review of the literature, 1932–2015 / K. Chatham-Stephens, S. Fleck-Derderian, S. D. Johnson [et al.] //Clinical Infectious Diseases. – 2018. – Vol. 66. – №. suppl_1. – P. S11-S16.
49. Chen, S. Oral vaccination with an adenovirus-vectored vaccine protects against botulism / S. Chen, Q. Xu, M. Zeng //Vaccine. – 2013. – Vol. 31. – №. 7. – P. 1009-1011.
50. Chen, Y. Thymus-derived glucocorticoids mediate androgen effects on thymocyte homeostasis / Y. Chen, S. Qiao, J. Tuckermann [et al.] //The FASEB Journal. – 2010. – Vol. 24. – №. 12. – P. 5043.
51. Cheng, L. W. Antibody protection against botulinum neurotoxin intoxication in mice / L. W. Cheng, L. H. Stanker, T. D. Henderson [et al.] //Infect. Immun. – 2009. – Vol. 77. – P. 4305-4313.
52. Chiarella, P. Mouse monoclonal antibodies in biological research: strategies for high-throughput production / P. Chiarella, V. M. Fazio //Biotechnology letters. – 2008. – Vol. 30. – P. 1303-1310.
53. Chow, S. K. Monoclonal antibodies and toxins—a perspective on function and isotype / S. K. Chow, A. Casadevall //Toxins. – 2012. – Vol. 4. – №. 6. – P. 430-454.

54. Claypool, S. M. Bidirectional transepithelial IgG transport by a strongly polarized basolateral membrane Fc γ -receptor / S. M. Claypool, B. L. Dickinson, J. S. Wagner [et al.] // *Molecular biology of the cell*. – 2004. – Vol. 15. – №. 4. – P. 1746-1759.
55. Clayton, J. Vaccination of mice with DNA encoding a large fragment of botulinum neurotoxin serotype A / J. Clayton, J. L. Middlebrook // *Vaccine*. – 2000. – Vol. 18. – №. 17. – P. 1855-1862.
56. ClinicalTrials.gov [Электронный ресурс]: сайт – URL: <https://clinicaltrials.gov/> (дата обращения: 21.12.2022). – Текст: электронный.
57. Coffield, J. A. In vitro characterization of botulinum toxin types A, C and D action on human tissues: combined electrophysiologic, pharmacologic and molecular biologic approaches / J. A. Coffield, N. Bakry, J. Carlson [et al.] // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1997. – Vol. 280. – №. 3. – P. 1489-1498.
58. Cooper, P. R. Efflux of monoclonal antibodies from rat brain by neonatal Fc receptor, FcRn / P. R. Cooper, G. J. Ciambone, C. M. Kliwinski [et al.] // *Brain research*. – 2013. – Vol. 1534. – P. 13-21.
59. Covell, D. G. Pharmacokinetics of monoclonal immunoglobulin G1, F (ab')₂, and Fab' in mice / D. G. Covell, J. Barbet, O. D. Holton [et al.] // *Cancer research*. – 1986. – Vol. 46. – №. 8. – P. 3969-3978.
60. Cui, Z. Complex sputum microbial composition in patients with pulmonary tuberculosis / Z. Cui, Y. Zhou, H. Li [et al.] // *BMC microbiology*. – 2012. – Vol. 12. – P. 1-8.
61. Danquah, W. Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation / W. Danquah, C. Meyer-Schwesinger, B. Rissiek // *Science translational medicine*. – 2016. – Vol. 8. – №. 366. – P. 366ra162-366ra162.
62. Datta-Mannan, A. Monoclonal antibody clearance: impact of modulating the interaction of IgG with the neonatal Fc receptor / A. Datta-Mannan, D. R. Witcher, Y. Tang [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282. – №. 3. – P. 1709-1717.
63. Davies, J. 'Camelising' human antibody fragments: NMR studies on VH domains / J. Davies, L. Riechmann // *FEBS letters*. – 1994. – Vol. 339. – №. 3. – P. 285-290.
64. De Genst, E. Chemical basis for the affinity maturation of a camel single domain antibody / E. De Genst, F. Handelberg, A. Van Meirhaeghe [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – №. 51. – P. 53593-53601.
65. De Genst, E. Strong in vivo maturation compensates for structurally restricted H3 loops in antibody repertoires / E. De Genst, K. Silence, M. A. Ghahroudi [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280. – №. 14. – P. 14114-14121.
66. Deantonio, C. Phage display technology for human monoclonal antibodies / C. Deantonio, D. Cotella, P. Macor [et al.] // *Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols*. – 2014. – P. 277-295.
67. Demarchi, J. Existence of type D botulism in man / J. Demarchi, C. Mourgues, J. Orio, A. R. Prevot // *Bulletin de l'Academie nationale de medecine*. – 1958. – Vol. 142. – №. 21-22. – P. 580-582.

68. Dembek, Z. F. Botulism: cause, effects, diagnosis, clinical and laboratory identification, and treatment modalities / Z. F. Dembek, L. A. Smith, J. M. Rusnak // Disaster medicine and public health preparedness. – 2007. – Vol. 1. – №. 2. – P. 122-134.
69. Deng, R. Monoclonal antibodies: what are the pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for drug development? / R. Deng, F. Jin, S. Prabhu, S. Iyer // Expert opinion on drug metabolism & toxicology. – 2012. – Vol. 8. – №. 2. – P. 141-160.
70. Deng, R. Pharmacokinetics of humanized monoclonal anti-tumor necrosis factor- α antibody and its neonatal Fc receptor variants in mice and cynomolgus monkeys / R. Deng, K. M. Loyet, S. Lien [et al.] // Drug Metabolism and Disposition. – 2010. – Vol. 38. – №. 4. – P. 600-605.
71. Diamant, E. Evaluating the synergistic neutralizing effect of anti-botulinum oligoclonal antibody preparations / E. Diamant, B. E. Lachmi, A. Keren [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9. – №. 1. – P. e87089.
72. Diamant, E. Monoclonal antibody combinations that present synergistic neutralizing activity: a platform for next-generation anti-toxin drugs / E. Diamant, A. Torgeman, E. Ozeri, R. Zichel // Toxins. – 2015. – Vol. 7. – №. 6. – P. 1854-1881.
73. Dickinson, B. L. Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line / B. L. Dickinson, K. Badizadegan, Z. Wu [et al.] // The Journal of clinical investigation. – 1999. – Vol. 104. – №. 7. – P. 903-911.
74. Dmitriev, O. Y. Nanobodies as probes for protein dynamics in vitro and in cells / O. Y. Dmitriev, S. Lutsenko, S. Muyldermans // Journal of Biological Chemistry. – 2016. – Vol. 291. – №. 8. – P. 3767-3775.
75. Domingo, R. M. Infant botulism: two recent cases and literature review / R. M. Domingo, J. S. Haller, M. Gruenthal // Journal of Child Neurology. – 2008. – Vol. 23. – №. 11. – P. 1336-1346.
76. Dübel S. Handbook of therapeutic antibodies / S. Dübel, J. M Reichert – John Wiley & Sons, 2014. – 2178 p.
77. Eleopra, R. Botulinum neurotoxin serotypes A and C do not affect motor units survival in humans: an electrophysiological study by motor units counting / R. Eleopra, V. Tugnoli, R. Quatralè [et al.] // Clinical neurophysiology. – 2002. – Vol. 113. – №. 8. – P. 1258-1264.
78. Emanuel, A. Efficacy of equine botulism antitoxin in botulism poisoning in a guinea pig model / A. Emanuel, H. Qiu, D. Barker [et al.] // PLoS One. – 2019. – Vol. 14. – №. 1. – P. e0209019.
79. Epidemiological data of botulism in Greece 2004-2020 [Электронный ресурс] // National Public Health Organization. – 2021. – URL: <https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2021/09/allantiasi-2004-2020-gr.pdf>. (дата обращения: 29.03.2022). – Текст: электронный.
80. Facts about botulism [Электронный ресурс] // European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) – 2023. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/botulism> (дата обращения: 06.01.2023). – Текст: электронный.

81. Fagan, R. P. Initial recovery and rebound of type F intestinal colonization botulism after administration of investigational heptavalent botulinum antitoxin / R. P. Fagan, K. P. Neil, R. Sasich // *Clinical Infectious Diseases*. – 2011. – Vol. 53. – №. 9. – P. e125-e128.
82. Fan, Y. Monoclonal antibodies targeting the alpha-exosite of botulinum neurotoxin serotype/A inhibit catalytic activity / Y. Fan, I. N. Geren, J. Dong [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – №. 8. – P. e0135306.
83. Fan, Y. Monoclonal antibodies that inhibit the proteolytic activity of botulinum neurotoxin serotype/B / Y. Fan, J. Dong, J. Lou [et al.] // *Toxins*. – 2015. – Vol. 7. – №. 9. – P. 3405-3423.
84. Feng, L. Two-family outbreak of botulism associated with the consumption of smoked ribs in Sichuan Province, China / L. Feng, X. Chen, S. Liu [et al.] // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2015. – Vol. 30. – P. 74-77.
85. Fleck-Derderian, S. The epidemiology of foodborne botulism outbreaks: a systematic review / S. Fleck-Derderian, M. Shankar, A. K. Rao // *Clinical infectious diseases*. – 2018. – Vol. 66. – №. suppl_1. – P. S73-S81.
86. Flessner, M. F. In vivo diffusion of immunoglobulin G in muscle: effects of binding, solute exclusion, and lymphatic removal / M. F. Flessner, J. Lofthouse, E. R. Zakaria // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 1997. – Vol. 273. – №. 6. – P. H2783-H2793.
87. Fujinaga, Y. Interaction of botulinum toxin with the epithelial barrier / Y. Fujinaga // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. – 2010. – Vol. 2010.
88. Garcia-Rodriguez, C. A three monoclonal antibody combination potently neutralizes multiple botulinum neurotoxin serotype E subtypes / C. Garcia-Rodriguez, A. Razai, I. N. Geren // *Toxins*. – 2018. – Vol. 10. – №. 3. – P. 105.
89. Gibney, M. A. Skin and subcutaneous adipose layer thickness in adults with diabetes at sites used for insulin injections: implications for needle length recommendations / M. A. Gibney, C. H. Arce, K. J. Byron, L. J. Hirsch // *Current medical research and opinion*. – 2010. – Vol. 26. – №. 6. – P. 1519-1530.
90. Godakova, S.A. Camelid VHHs Fused to Human Fc Fragments Provide Long Term Protection Against Botulinum Neurotoxin A in Mice / S.A. Godakova, A.N. Noskov, I.D. Vinogradova [et al.] // *Toxins*. – 2019. – Vol. 11. – №. 8. – P. 464.
91. Guo, C. Choice of selectable marker affects recombinant protein expression in cells and exosomes / C. Guo, F. K. Fordjour, S. J. Tsai [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – Vol. 297. – №. 1.
92. Hamers-Casterman, C. Naturally occurring antibodies devoid of light chains / C. T. S. G. Hamers-Casterman, T. Atarhouch, S. A. Muyldermans [et al.] // *Nature*. – 1993. – Vol. 363. – №. 6428. – P. 446-448.
93. Hansel, T. T. The safety and side effects of monoclonal antibodies / T. T. Hansel, H. Kropshofer, T. Singer [et al.] // *Nature reviews Drug discovery*. – 2010. – Vol. 9. – №. 4. – P. 325-338.
94. Harding, F. A. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions / F. A. Harding, M.M. Sticler, J. Razo, R.B DuBridg // *MAbs*. – 2010. – Vol. 2. – P. 256-65.

95. Harmsen, M. M. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments / M. M. Harmsen, H. J. De Haard // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2007. – Vol. 77. – P. 13-22.
96. Hassan, M. S. Biological half-life of normal and truncated human IgG3 in scid mice / M. S. Hassan // *European journal of immunology*. – 1991. – Vol. 21. – №. 5. – P. 1319-1322.
97. Hassani, M. Construction of a chimeric antigen receptor bearing a nanobody against prostate a specific membrane antigen in prostate cancer / M. Hassani, F. Hajari Taheri, Z. Sharifzadeh // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2019. – Vol. 120. – №. 6. – P. 10787-10795.
98. Hassanzadeh-Ghassabeh, G. Nanobodies and their potential applications / G. Hassanzadeh-Ghassabeh, N. Devoogdt, P. De Pauw [et al.] // *Nanomedicine*. – 2013. – Vol. 8. – №. 6. – P. 1013-1026.
99. Hellmich, D. Foodborne botulism due to ingestion of home-canned green beans: two case reports / D. Hellmich, K. E. Wartenberg, S. Zierz, T. J. Mueller // *Journal of Medical Case Reports*. – 2018. – Vol. 12. – №. 1. – P. 1-5.
100. Henry, K. A. Antigen recognition by single-domain antibodies: structural latitudes and constraints / K. A. Henry, C. R. MacKenzie // *MAbs*. – Taylor & Francis, 2018. – Vol. 10. – №. 6. – P. 815-826.
101. Hill, K. K. Genetic diversity among botulinum neurotoxin-producing clostridial strains / K. K. Hill, T. J. Smith, C. H. Helma [et al.] // *Journal of bacteriology*. – 2007. – Vol. 189. – №. 3. – P. 818-832.
102. Hmila, I. A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming / I. Hmila, D. Saerens, R. B. Abderrazek [et al.] // *The FASEB Journal*. – 2010. – Vol. 24. – №. 9. – P. 3479-3489.
103. Holland, M. Anti-neutrophil cytoplasm antibody IgG subclasses in Wegener's granulomatosis: a possible pathogenic role for the IgG4 subclass / M. Holland, P. Hewins, M. Goodall // *Clinical & Experimental Immunology*. – 2004. – Vol. 138. – №. 1. – P. 183-192.
104. Holzlöhner, P. Generation of murine monoclonal antibodies by hybridoma technology / P. Holzlöhner, K. Hanack // *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. – 2017. – №. 119. – P. e54832.
105. Humeau, Y. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release / Y. Humeau, F. Doussau, N. J. Grant, B. Poulain // *Biochimie*. – 2000. – Vol. 82. – №. 5. – P. 427-446.
106. Jackson, K. A. Botulism mortality in the USA, 1975-2009 / K. A. Jackson, B. E. Mahon, J. Copeland, R. P. Fagan // *The botulinum journal*. – 2015. – Vol. 3. – №. 1. – P. 6-17.
107. Jefferis, R. Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action / R. Jefferis // *Trends in pharmacological sciences*. – 2009. – Vol. 30. – №. 7. – P. 356-362.
108. Jiang, X. R. Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies / X. R. Jiang, A. Song, S. Bergelson [et al.] // *Nature reviews Drug discovery*. – 2011. – Vol. 10. – №. 2. – P. 101-111.

109. Jin, F. Mechanisms of intravenous immunoglobulin action in immune thrombocytopenic purpura / F. Jin, J. P. Balthasar // *Human immunology*. – 2005. – Vol. 66. – №. 4. – P. 403-410.
110. Jovčevska, I. The therapeutic potential of nanobodies / I. Jovčevska, S. Muyldermans // *BioDrugs*. – 2020. – Vol. 34. – №. 1. – P. 11-26.
111. Junttila, T. T. Superior in vivo efficacy of afucosylated trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer / T. T. Junttila, K. Parsons, C. Olsson [et al.] // *Cancer research*. – 2010. – Vol. 70. – №. 11. – P. 4481-4489.
112. Kagan, L. Subcutaneous absorption of monoclonal antibodies: role of dose, site of injection, and injection volume on rituximab pharmacokinetics in rats / L. Kagan, M. R. Turner, S. V. Balu-Iyer, D. E. Mager // *Pharmaceutical research*. – 2012. – Vol. 29. – P. 490-499.
113. Kairemo, K. J. In vivo detection of intervertebral disk injury using a radiolabeled monoclonal antibody against keratan sulfate / K. J. Kairemo, A. K. Lappalainen, E. Kääpä [et al.] // *Journal of Nuclear Medicine*. – 2001. – Vol. 42. – №. 3. – P. 476-482.
114. Kaneko, Y. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation / Y. Kaneko, F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch / Y. Kaneko, F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch // *science*. – 2006. – Vol. 313. – №. 5787. – P. 670-673.
115. Keck, R. Characterization of a complex glycoprotein whose variable metabolic clearance in humans is dependent on terminal N-acetylglucosamine content / R. Keck, N. Nayak, L. Lerner [et al.] // *Biologicals*. – 2008. – Vol. 36. – №. 1. – P. 49-60.
116. Khantasup, K. Design and generation of humanized single-chain Fv derived from mouse hybridoma for potential targeting application / K. Khantasup, W. Chantima, C. Sangma [et al.] // *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*. – 2015. – Vol. 34. – №. 6. – P. 404-417.
117. Kim, J. Kinetics of FcRn-mediated recycling of IgG and albumin in human: pathophysiology and therapeutic implications using a simplified mechanism-based model / J. Kim, W. L. Hayton, J. M. Robinson, C. L. Anderson // *Clinical immunology*. – 2007. – Vol. 122. – №. 2. – P. 146-155.
118. Kim, T. Y. Prolonged half-life of small-sized therapeutic protein using serum albumin-specific protein binder / T. Y. Kim, J. H. Park, H. E. Shim // *Journal of Controlled Release*. – 2019. – Vol. 315. – P. 31-39.
119. Kingwell, K. New targets for drug delivery across the BBB / K. Kingwell // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2016. – Vol. 15. – №. 2. – P. 84-85.
120. Kodihalli, S. Therapeutic efficacy of equine botulism antitoxin in Rhesus macaques / S. Kodihalli, A. Emanuel, T. Takla [et al.] // *PloS one*. – 2017. – Vol. 12. – №. 11. – P. e0186892.
121. Kohler, G. Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody-antigen interactions / G. Kohler, C. Milstein // *Nature*. – 1975. – Vol. 256. – №. 5517. – P. 495-497.

122. Kontermann, R. E. Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics / R. E. Kontermann // *Current opinion in biotechnology*. – 2011. – Vol. 22. – №. 6. – P. 868-876.
123. Kontermann, R. E. Strategies to extend plasma half-lives of recombinant antibodies / R. E. Kontermann // *BioDrugs*. – 2009. – Vol. 23. – P. 93-109.
124. Kota, J. Lymphatic absorption of subcutaneously administered proteins: influence of different injection sites on the absorption of darbepoetin alfa using a sheep model / J. Kota, K. K. Machavaram, D. N. McLennan [et al.] // *Drug metabolism and disposition*. – 2007. – Vol. 35. – №. 12. – P. 2211-2217.
125. Kügler, M. Stabilization and humanization of a single-chain Fv antibody fragment specific for human lymphocyte antigen CD19 by designed point mutations and CDR-grafting onto a human framework / M. Kügler, C. Stein, M. Schwenkert [et al.] // *Protein Engineering, Design & Selection*. – 2009. – Vol. 22. – №. 3. – P. 135-147.
126. Kumar, R. Phage display antibody libraries: A robust approach for generation of recombinant human monoclonal antibodies / R. Kumar, H. A. Parray, T. Shrivastava [et al.] // *International journal of biological macromolecules*. – 2019. – Vol. 135. – P. 907-918.
127. Kunz, P. Nanobody stability engineering by employing the ΔT_m shift; a comparison with apparent rate constants of heat-induced aggregation. / P. Kunz, A. Ortale, N. Mücke [et al.] // *Protein Engineering, Design and Selection*. – 2019. – Vol. 32. – №. 5. – P. 241-249.
128. Kurosawa, N. Rapid production of antigen-specific monoclonal antibodies from a variety of animals / N. Kurosawa, M. Yoshioka, R. Fujimoto [et al.] // *BMC biology*. – 2012. – Vol. 10. – №. 1. – P. 1-15.
129. LaPenotiere, H. F. Expression of a large, nontoxic fragment of botulinum neurotoxin serotype A and its use as an immunogen / H. F. LaPenotiere, M. A. Clayton, J. L. Middlebrook // *Toxicon*. – 1995. – Vol. 33. – №. 10. – P. 1383-1386.
130. Lasaro, M. O. New insights on adenovirus as vaccine vectors / M. O. Lasaro, H. C. Ertl // *Molecular Therapy*. – 2009. – Vol. 17. – №. 8. – P. 1333-1339.
131. Leader, B. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification / B. Leader, Q. J. Baca, D. E. Golan // *Nature reviews Drug discovery*. – 2008. – Vol. 7. – №. 1. – P. 21-39.
132. Lecocq, Q. Theranostics in immuno-oncology using nanobody derivatives / Q. Lecocq, Y. De Vlaeminck, H. Hanssens, // *Theranostics*. – 2019. – Vol. 9. – №. 25. – P. 7772.
133. Legouffe, E. Human anti-mouse antibody response to the injection of murine monoclonal antibodies against IL-6 / E. Legouffe, J. Liautard, J. A. Gaillard [et al.] // *Clinical & Experimental Immunology*. – 1994. – Vol. 98. – №. 2. – P. 323-329.
134. Li, J. Research and development of next generation of antibody-based therapeutics / J. Li, Z. Zhu // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2010. – Vol. 31. – №. 9. – P. 1198-1207.
135. Lim, C. Y. SERS detection of Clostridium botulinum neurotoxin serotypes A and B in buffer and serum: Towards the development of a biodefense test platform / C.

Y. Lim, J. H. BGranger, M. D. Porter //Analytica Chimica Acta: X. – 2019. – Vol. 1. – P. 100002.

136. Lin, W. B-cell display-based one-step method to generate chimeric human IgG monoclonal antibodies / W. Lin, K. Kurosawa, A. Murayama [et al.] //Nucleic acids research. – 2011. – Vol. 39. – №. 3. – P. 1-10.

137. Loisel, S. Relevance, advantages and limitations of animal models used in the development of monoclonal antibodies for cancer treatment / S. Loisel, M. Ohresser, M. Pallardy [et al.] //Critical reviews in oncology/hematology. – 2007. – Vol. 62. – №. 1. – P. 34-42.

138. Lonberg, N. Human antibodies from transgenic animals / N. Lonberg //Nature biotechnology. – 2005. – Vol. 23. – №. 9. – P. 1117-1125.

139. Lu, R. M. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases / R. M. Lu, Y. C. Hwang, I. J. Liu [et al.] //Journal of biomedical science. – 2020. – Vol. 27. – №. 1. – P. 1-30.

140. Lu, R. M. Single chain anti-c-Met antibody conjugated nanoparticles for in vivo tumor-targeted imaging and drug delivery / R. M. Lu, Y. L. Chang, M. S. Chen, H. C. Wu //Biomaterials. – 2011. – Vol. 32. – №. 12. – P. 3265-3274.

141. Lutterotti, A. Getting specific: monoclonal antibodies in multiple sclerosis / A. Lutterotti, R. Martin //The Lancet Neurology. – 2008. – Vol. 7. – №. 6. – P. 538-547.

142. Lutwick, L. I. Beyond anthrax: the weaponization of infectious diseases / L. I. Lutwick, S. M. Lutwick – Springer Science & Business Media, 2008. – 374 p.

143. Machamer, J. B. Antidotal treatment of botulism in rats by continuous infusion with 3, 4-diaminopyridine / J. B. Machamer, E. J. Vazquez-Cintron, S. W. O'Brien [et al.] //Molecular Medicine. – 2022. – Vol. 28. – №. 1. – P. 1-14.

144. Mak, T. M. Chimerization and characterization of a monoclonal antibody with potent neutralizing activity across multiple influenza A H5N1 clades / T. M. Mak, B. J. Hanson, Y. J. Tan //Antiviral research. – 2014. – Vol. 107. – P. 76-83.

145. Mant, C. T. HPLC analysis and purification of peptides. / C. T. Mant, Y. Chen, Z. Yan, T.V. Popa, J. M. Kovacs, J.B. Mills, B.P. Tripet, R. S. Hodges // Methods in Molecular Biology. – 2007. – Vol. 386. – P. 3-55

146. Maslanka, S. E. A novel botulinum neurotoxin, previously reported as serotype H, has a hybrid-like structure with regions of similarity to the structures of serotypes A and F and is neutralized with serotype A antitoxin / S. E. Maslanka, C. Lúquez, J. K. Dykes [et al.] //The Journal of infectious diseases. – 2016. – Vol. 213. – №. 3. – P. 379-385.

147. Mazuet, C. Characterization of botulinum neurotoxin type A neutralizing monoclonal antibodies and influence of their half-lives on therapeutic activity / C. Mazuet, J. Dano, M. R. Popoff [et al.] //PLoS One. – 2010. – Vol. 5. – №. 8. – P. e12416.

148. McDonald, T. A. Subcutaneous administration of biotherapeutics: current experience in animal models / T. A. McDonald, M. L. Zepeda, M. J. Tomlinson [et al.] //Curr Opin Mol Ther. – 2010. – Vol. 12. – №. 4. – P. 461-70.

149. Medecigo, M. Novel amyloid-beta specific scFv and VH antibody fragments from human and mouse phage display antibody libraries / M. Medecigo, K.

Manoutcharian, V. Vasilevko [et al.] //Journal of neuroimmunology. – 2010. – Vol. 223. – №. 1-2. – P. 104-114.

150. Meibohm, B. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of peptide and protein therapeutics / B. Meibohm //Pharmaceutical biotechnology: fundamentals and applications. – 2013. – P. 101-132.

151. Metzger, J. F. Human-derived immune globulins for the treatment of botulism / J. F. Metzger, G. E. Lewis Jr //Reviews of Infectious Diseases. – 1979. – Vol. 1. – №. 4. – P. 689-692.

152. Miethe, S. Development of neutralizing scFv-Fc against botulinum neurotoxin A light chain from a macaque immune library / S. Miethe, C. Rasetti-Escargueil, Y. Liu [et al.] //MAbs. – Taylor & Francis, 2014. – Vol. 6. – №. 2. – P. 446-459.

153. Moore, N. M. The effect of endosomal escape peptides on in vitro gene delivery of polyethylene glycol-based vehicles / N. M. Moore, C. L. Sheppard, T. R. Barbour, S. E. Sakiyama-Elbert //The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications. – 2008. – Vol. 10. – №. 10. – P. 1134-1149.

154. Mukherjee, J. Sheep monoclonal antibodies prevent systemic effects of botulinum neurotoxin A1 / J. Mukherjee, C. McCann, K. Ofori [et al.] //Toxins. – 2012. – Vol. 4. – №. 12. – P. 1565-1581.

155. Muyldermans, S. Nanobodies: natural single-domain antibodies / S. Muyldermans //Annual review of biochemistry. – 2013. – Vol. 82. – P. 775-797.

156. Muyldermans, S. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains / S. Muyldermans, C. Cambillau, L. Wyns //Trends in biochemical sciences. – 2001. – Vol. 26. – №. 4. – P. 230-235.

157. National botulism surveillance summary 2016 [Электронный ресурс] // Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA. – 2016. – URL: <https://www.cdc.gov/botulism/pdf/Botulism-2016-SUMMARY-508.pdf> (дата обращения: 29.03.2022). – Текст: электронный.

158. Newkirk, M. M. Differential clearance of glycoforms of IgG in normal and autoimmune-prone mice / M. M. Newkirk, J. Novick, M. M. Stevenson [et al.] //Clinical & Experimental Immunology. – 1996. – Vol. 106. – №. 2. – P. 259-264.

159. Ni, S. A. Botulism antitoxin / S. A. Ni, M. F. Brady //StatPearls. – StatPearls Publishing, 2022.

160. O'Brien, L. M. A humanised murine monoclonal antibody protects mice from Venezuelan equine encephalitis virus, Everglades virus and Mucambo virus when administered up to 48 h after airborne challenge / L. M. O'Brien, S. A. Goodchild, R. J. Phillpotts, S. D. Perkins //Virology. – 2012. – Vol. 426. – №. 2. – P. 100-105.

161. Parray, H. A. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives / H. A. Parray, S. Shukla, S. Samal [et al.] //International immunopharmacology. – 2020. – Vol. 85. – P. 106639.

162. Peck, M. W. Clostridium botulinum in the post-genomic era / M. W. Peck, S. C. Stringer, A. T. Carter //Food microbiology. – 2011. – Vol. 28. – №. 2. – P. 183-191.

163. Prevot, A. R. A Biological Enigma: the Cat and Botulism / A. R. Prevot, R. Sillic // *Ann. Inst. Pasteur.* – 1955. – Vol. 89. – №. 3. – P. 354-7.
164. Quintero-Hernández, V. The change of the scFv into the Fab format improves the stability and in vivo toxin neutralization capacity of recombinant antibodies / V. Quintero-Hernández, V. R. Juárez-González, M. Ortiz-León [et al.] // *Molecular immunology.* – 2007. – Vol. 44. – №. 6. – P. 1307-1315.
165. Rao, A. K. Clinical characteristics and ancillary test results among patients with botulism—United States, 2002–2015 / A. K. Rao, N. H. Lin, K. A. Jackson [et al.] // *Clinical Infectious Diseases.* – 2018. – Vol. 66. – №. suppl_1. – P. S4-S10.
166. Rao, A. K. Clinical guidelines for diagnosis and treatment of botulism, 2021 / A. K. Rao, J. Sobel, K. Chatham-Stephens, C. Luquez // *MMWR Recommendations and Reports.* – 2021. – Vol. 70. – №. 2. – P. 1.
167. Rasetti-Escargueil, C. Human botulism in France, 1875–2016 / C. Rasetti-Escargueil, E. Lemichez, M. R. Popoff // *Toxins.* – 2020. – Vol. 12. – №. 5. – P. 338.
168. Rasetti-Escargueil, C. Public health risk associated with botulism as foodborne zoonoses / C. Rasetti-Escargueil, E. Lemichez, M. R. Popoff // *Toxins.* – 2019. – Vol. 12. – №. 1. – P. 17.
169. Ravichandran, E. An initial assessment of the systemic pharmacokinetics of botulinum toxin / E. Ravichandran, Y. Gong, F. H. Al Saleem [et al.] // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* – 2006. – Vol. 318. – №. 3. – P. 1343-1351.
170. Reddy, S. T. A sensitive in vivo model for quantifying interstitial convective transport of injected macromolecules and nanoparticles / S. T. Reddy, D. A. Berk, R. K. Jain, M. A. Swartz // *Journal of applied physiology.* – 2006. – Vol. 101. – №. 4. – P. 1162-1169.
171. Reichert, J. M. Antibody-based therapeutics to watch in 2011 / J. M. Reichert // *MAbs.* – Taylor & Francis, 2011. – Vol. 3. – №. 1. – P. 76-99.
172. Reusch, D. Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes / D. Reusch, M. L. Tejada // *Glycobiology.* – 2015. – Vol. 25. – №. 12. – P. 1325-1334.
173. Robinson, J. P. Public health response to biological and chemical weapons: WHO guidance / J. P. Robinson // World Health Organization, 2004.
174. Rodrigues, M. E. Technological progresses in monoclonal antibody production systems / M. E. Rodrigues, A. R. Costa, M. Henriques [et al.] // *Biotechnology Progress.* – 2010. – Vol. 26. – №. 2. – P. 332-351.
175. Rogers, D. E. Clinical and laboratory manifestations of type E botulism in man / D. E. Rogers, M. G. Koenig, A. Spickard // *Transactions of the Association of American Physicians.* – 1964. – Vol. 77. – P. 135-144.
176. Roopenian, D. C. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age / D. C. Roopenian, S. Akilesh // *Nature reviews immunology.* – 2007. – Vol. 7. – №. 9. – P. 715-725.
177. Rossetto, O. Tables of toxicity of botulinum and tetanus neurotoxins / O. Rossetto, C. Montecucco // *Toxins.* – 2019. – Vol. 11. – №. 12. – P. 686.
178. Rossetto, O. The role of the single interchains disulfide bond in tetanus and botulinum neurotoxins and the development of antitetanus and antibotulism drugs / O.

Rossetto, M. Pirazzini, F. Lista, C. Montecucco //Cellular Microbiology. – 2019. – Vol. 21. – №. 11. – P. e13037.

179. Rusnak, J. M. Botulinum Neurotoxins from Clostridium botulinum / J. M. Rusnak, L. A. Smith //Manual of Security Sensitive Microbes and Toxins. – 2014. – P. 451.

180. Rusnak, J. M. Botulinum neurotoxin vaccines: Past history and recent developments / J. M. Rusnak, L. A. Smith //Human vaccines. – 2009. – Vol. 5. – №. 12. – P. 794-805.

181. Ryman, J. T. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies / J. T. Ryman, B. Meibohm //CPT: pharmacometrics & systems pharmacology. – 2017. – Vol. 6. – №. 9. – P. 576-588.

182. Scalfaro, C. Foodborne botulism: an evolving public health challenge / C. Scalfaro, B. Auricchio, D. De Medici, F. Anniballi //Infectious Diseases. – 2019. – Vol. 51. – №. 2. – P. 97-101.

183. Scanes, C. G. Animal attributes exploited by humans (nonfood uses of animals) / C. G. Scanes //Animals and human society. – Academic Press, 2018. – P. 13-40.

184. Semenko, N. Foodborne Botulism in Ukraine from 1955 to 2018 / N. Semenko, H. Mokhort, O. Sokolovska [et al.] //Foodborne Pathogens and Disease. – 2021. – Vol. 18. – №. 4. – P. 260-266.

185. Shcheblyakov, D. Development and characterization of two GP-specific monoclonal antibodies, which synergistically protect non-human primates against Ebola lethal infection / D. Shcheblyakov, I. Esmagambetov, P. Simakina //Antiviral Research. – 2019. – Vol. 172. – P. 104617.

186. Sheets, M. D. Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens / M. D. Sheets, P. Amersdorfer, R. Finnern [et al.] //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1998. – Vol. 95. – №. 11. – P. 6157-6162.

187. Shoemaker, C. B. Design options for mRNA-encoded BoNT Antitoxins employing camelid single-domain antibody (VHH) components / C. B. Shoemaker, K. H. Lam, M. Thran //Toxicon. – 2018. – Vol. 156. – P. S104-S105.

188. Silva, R. O. S. Type C botulism in domestic chickens, dogs and black-pencilled marmoset (*Callithrix penicillata*) in Minas Gerais, Brazil / R. O. S. Silva, R. A. Martins, R. A. Assis [et al.] //Anaerobe. – 2018. – Vol. 51. – P. 47-49.

189. Simpson, L. L. Identification of the major steps in botulinum toxin action / L. L. Simpson //Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2004. – Vol. 44. – P. 167-193.

190. Siontorou, C. G. Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy / C. G. Siontorou //International journal of nanomedicine. – 2013. – Vol. 4215-4227.

191. Skarin, H. Clostridium botulinum group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements / H. Skarin, T. Håfström, J. Westerberg, B. Segerman //BMC genomics. – 2011. – Vol. 12. – P. 1-13.

192. Sobel, J. Botulism / J. Sobel //Beyond anthrax: the weaponization of infectious diseases. – 2009. – P. 85-105.

193. Sobel, J. Clinical recovery and circulating botulinum toxin type F in adult patient / J. Sobel, T. Dill, C. L. Kirkpatrick [et al.] //Emerging infectious diseases. – 2009. – Vol. 15. – №. 6. – P. 969.
194. Solforosi, L. A phage display vector optimized for the generation of human antibody combinatorial libraries and the molecular cloning of monoclonal antibody fragments / L. Solforosi, N. Mancini, F. Canducci [et al.] //New Microbiologica. – 2012. – Vol. 35. – №. 3. – P. 289-294.
195. Steinitz, M. Human Monoclonal Antibodies / M. Steinitz//Methods in molecular biology (Clifton, NJ) – 2014. – Vol. 22.
196. Strebhardt, K. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress / K. Strebhardt, A. Ullrich //Nature Reviews Cancer. – 2008. – Vol. 8. – №. 6. – P. 473-480.
197. Strohl, W. R. Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies / W. R. Strohl //Current opinion in biotechnology. – 2009. – Vol. 20. – №. 6. – P. 685-691.
198. Stuchbury, G. Optimizing the generation of stable neuronal cell lines via pre-transfection restriction enzyme digestion of plasmid DNA / G. Stuchbury, G. Münch //Cytotechnology. – 2010. – Vol. 62. – P. 189-194.
199. Swartz, M. A. The physiology of the lymphatic system / M. A. Swartz //Advanced drug delivery reviews. – 2001. – Vol. 50. – №. 1-2. – P. 3-20.
200. Tamura, M. Structural correlates of an anticarcinoma antibody: identification of specificity-determining residues (SDRs) and development of a minimally immunogenic antibody variant by retention of SDRs only / M. Tamura, D. E. Milenic, M. Iwahashi [et al.] //the Journal of Immunology. – 2000. – Vol. 164. – №. 3. – P. 1432-1441.
201. Terilli, R. R. A historical and proteomic analysis of botulinum neurotoxin type/G / R. R. Terilli, H. Moura, A. R. Woolfitt [et al.] //BMC microbiology. – 2011. – Vol. 11. – P. 1-12.
202. Tomita, M. Immunohistochemical phenotyping of liver macrophages in normal and diseased human liver / M. Tomita, K. Yamamoto, H. Kobashi [et al.] //Hepatology. – 1994. – Vol. 20. – №. 2. – P. 317-325.
203. Tracey, D. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review / D. Tracey, L. Klareskog, E. H. Sasso [et al.] // Pharmacol Ther. – 2008. – Vol. 117. – P. 244-79.
204. Tremblay, J. M. Camelid single domain antibodies (VHHs) as neuronal cell intrabody binding agents and inhibitors of Clostridium botulinum neurotoxin (BoNT) proteases / J. M. Tremblay, C. L. Kuo, C. Abeijon [et al.] //Toxicon. – 2010. – Vol. 56. – №. 6. – P. 990-998.
205. Uniprot. – National Institutes of Health: сайт – 2023 – URL: <https://www.uniprot.org/> (дата обращения: 15.06.2022). – Текст: электронный.
206. Van Audenhove, I. Nanobodies as versatile tools to understand, diagnose, visualize and treat cancer / I. Van Audenhove, J. Gettemans //EBioMedicine. – 2016. – Vol. 8. – P. 40-48.

207. Van Ermengem, E. A new anaerobic bacillus and its relation to botulism / E. Van Ermengem //Reviews of infectious diseases. – 1979. – P. 701-719.
208. Vazquez-Cintron, E. Symptomatic treatment of botulism with a clinically approved small molecule / E. Vazquez-Cintron, J. Machamer, C. Oudeck [et al.] //JCI insight. – 2020. – Vol. 5. – №. 2.
209. Vincke, C. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold / C. Vincke, R. Loris, D. Saerens [et al.] //Journal of Biological Chemistry. – 2009. – Vol. 284. – №. 5. – P. 3273-3284.
210. Vitale, L. Prophylaxis and therapy of inhalational anthrax by a novel monoclonal antibody to protective antigen that mimics vaccine-induced immunity / L. Vitale, D. Blanset, I. Lowy [et al.] //Infection and immunity. – 2006. – Vol. 74. – №. 10. – P. 5840-5847.
211. Vugmeyster, Y. Complex pharmacokinetics of a humanized antibody against human amyloid beta peptide, anti-abeta Ab2, in nonclinical species / Y. Vugmeyster, P. Szklut, D. Wensel [et al.] //Pharmaceutical research. – 2011. – Vol. 28. – P. 1696-1706.
212. Walker, K. W. Pharmacokinetic comparison of a diverse panel of non-targeting human antibodies as matched IgG1 and IgG2 isotypes in rodents and non-human primates / K. W. Walker, H. Salimi-Moosavi, G. E. Arnold [et al.] //PLoS One. – 2019. – Vol. 14. – №. 5. – P. e0217061.
213. Weigle, W. O. Anaphylactogenic properties of soluble antigen-antibody complexes in the guinea pig and rabbit / W. O. Weigle, C. G. Cochrane, F. J. Dixon //The Journal of Immunology. – 1960. – Vol. 85. – №. 5. – P. 469-477.
214. Weiner, L. M. An overview of monoclonal antibody therapy of cancer / L. M. Weiner //Seminars in oncology. – 1999. – Vol. 26. – №. 4 Suppl 12. – P. 41-50.
215. Wurm, F. M. Cloning of CHO cells, productivity and genetic stability—a discussion / F. M. Wurm, M. J. Wurm //Processes. – 2017. – Vol. 5. – №. 2. – P. 20.
216. Xin, W. Identification and characterization of Clostridium botulinum strains associated with an infant botulism case in China / W. Xin, Y. Huang, B. Ji [et al.] //Anaerobe. – 2019. – Vol. 55. – P. 1-7.
217. Xu, Q. An adenoviral vector-based mucosal vaccine is effective in protection against botulism / Q. Xu, M. E. Pichichero, L. L. Simpson, M. Elias [et al.] //Gene therapy. – 2009. – Vol. 16. – №. 3. – P. 367-375.
218. Yamane-Ohnuki, N. Production of therapeutic antibodies with controlled fucosylation / N. Yamane-Ohnuki, M. Satoh //MAbs. – Taylor & Francis, 2009. – Vol. 1. – №. 3. – P. 230-236.
219. Yang, W. Screening Strategies for High-Yield Chinese Hamster Ovary Cell Clones / W. Yang, J. Zhang, Y. Xiao [et al.] //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – Vol. 10.
220. Yeung, Y. A. Engineering human IgG1 affinity to human neonatal Fc receptor: impact of affinity improvement on pharmacokinetics in primates / Y. A. Yeung, M. K. Leabman, J. S. Marvin [et al.] //The Journal of Immunology. – 2009. – Vol. 182. – №. 12. – P. 7663-7671.

221. Zeng, M. Protective immunity against botulism provided by a single dose vaccination with an adenovirus-vectored vaccine / M. Zeng, Q. Xu, M. D. Elias [et al.] //Vaccine. – 2007. – Vol. 25. – №. 43. – P. 7540-7548.

222. Zhao, L. The antibody drug absorption following subcutaneous or intramuscular administration and its mathematical description by coupling physiologically based absorption process with the conventional compartment pharmacokinetic model / L. Zhao, P. Ji, Z. Li [et al.] //The Journal of Clinical Pharmacology. – 2013. – Vol. 53. – №. 3. – P. 314-325.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность моему научному руководителю, к.б.н. Есмагамбетову И.Б. за поддержку, внимание и всестороннюю помощь. Искренне благодарю д.б.н. Носкова А.Н., к.б.н. Виноградову И.Д. и Годакову С.А. за помощь и ценные советы в работе. Особую благодарность выражаю к.б.н. Щеблякову Д.В. за рекомендации по выполнению научной работы и предоставление возможности выполнения диссертационной работы. Выражаю искреннюю благодарность Рябовой Е.И. и Прокофьеву В.В. за помощь в выполнении отдельных этапов работы. Выражаю благодарность всем сотрудникам лабораторий иммунобиотехнологии, стромальной регуляции иммунитета, клеточной микробиологии, молекулярной биотехнологии, лаборатории анализа геномов за помощь в выполнении исследований. Отдельную благодарность выражаю к.б.н. Карпову А.П., Государеву А.И. и другим сотрудникам Филиала «Медгамал» за помощь в масштабировании технологии получения кандидатного препарата, а также наработку препарата для проведения клинических исследований. Выражаю признательность ученому секретарю ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» к.б.н. Сысолятиной Е.В., ученому секретарю диссертационного совета д.б.н. Ермолаевой С.А., профессору, д.м.н. Русаковой Е.В., заведующей аспирантурой Рудь О.Н., рецензентам к.б.н. Коноплевой М.В. и д.б.н. Горской Ю.Ф. за помощь в подготовке материала диссертации к защите.